

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 29 May 2000 (29.05.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/06016	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 99342M
<b>International filing date</b> (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
<b>Applicant</b> SUSAKI, Hiroshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 29 October 1999 (29.10.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Henrik Nyberg

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

JP9906016

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99342M	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06016	International filing date (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 47/48, 47/30, 47/26, 31/47		
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 October 1999 (29.10.99)	Date of completion of this report 21 July 2000 (21.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06016

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06016

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-23,25,26,28,29,31,33-38	YES
	Claims	24,27,30,32	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-38	NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims	1-38	NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: WO, 97/46260, A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.) 11 December 1997 (11.12.97) (Document cited in this application)

Document 2: JP, 8-85703, A (DDS Kenkyusho, K.K.) 2 April 1996 (02.04.96) (Document cited in this application) see Par. No. 0027

Document 3: EP, 712635, A1 (Kuraray Co., Ltd.) 22 May 1996 (22.05.96)

Document 4: JP, 6-87746, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.)

**Claims 1-23**

Document 1 describes a DDS compound that contains a carboxy C<sub>1-4</sub> alkyl dextran polyalcohol as a polymer carrier, and document 2 describes a polysaccharide compound carrier, a saccharide bonded to a carrier via a linker in order to improve distribution to organs, and a DDS compound constituting a medicine using a peptide and the like as a spacer when carried on a carrier. Therefore, persons skilled in the art can easily use the carrier described in document 2 in place of the carboxy C<sub>1-4</sub>alkyl dextran polyalcohol described in document 1, and the subject matter of Claims 1-23 does not appear to involve an inventive step.

**Claims 24-38**

1) Document 3 (see Par. No. 0030) describes a polymer gel for use in medicines (that can be taken orally as a base for sustained release of medication) in which a medicine (anticancer drug, antiinflammatory drug and the like) is affixed to a water-expanding polymer gel (a polysaccharide with carboxyl groups in the molecule and the like) via a lytic group in which the main chain can be cleaved by an enzymatic reaction (amino acid or oligopeptide of 2-6 units) and a spacer. Experimental Example 3 of this document describes quantitation by HPLC of the amount of mafenide, which is the product of hydrolysis after treatment with elastase. Therefore, the subject matter of Claims 24, 27, 30 and 32 does not appear to be novel.

2) Persons skilled in the art performing R&D directed toward the clinical application of DDS for oral administration measure the amount of DDS compounds themselves in the body and measure

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

national application No.

PCT/JP99/06016

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of Box V (Citations and explanations):

the content of the residues of drugs that have been introduced into the DDS compound as a matter of course. Persons skilled in the art can easily perform these measurements by the procedure for measuring drugs released by enzymatic degradation of DDS compounds (see, document 3, Experimental Example 3). Therefore, the subject matter of Claims 25 and 26 does not appear to involve an inventive step.

3) In consideration of the types of organs to be targeted, persons skilled in the art can select as needed the peptide used as the spacer, the enzyme used to cleave the peptide, and the like. Therefore, the subject matter of Claims 28, 29, and 33-35 does not appear to involve an inventive step.

4) Selection of (9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H, 12H-benzo[de]pyrano [3',4':6,7] indolidino [1,2-b] quinoline-10,13 (9H, 15H)-dione described in document 4 as an antitumor drug does not pose particular difficulty, and therefore the subject matter of Claims 36-38 does not appear to involve an inventive step.

E P



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 99342M	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06016	国際出願日 (日.月.年) 29.10.99	優先日 (日.月.年) 30.10.98
出願人(氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAPLUS (STN)  
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/46260, A1 (第一製薬株式会社) ~ 11. 12月. 1997 (11. 12. 97) & EP, 916348, A1	1-23, 31, 37, 38
Y	JP, 8-319317, A (財団法人 神奈川科学技術アカ デミー) 3. 12月. 1996 (03. 12. 96) 【0005】 - 【0007】 (ファミリーなし)	1-23
X	EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD) 22. 5月. 1996 (22. 05. 96)	24-30, 32-35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 26. 01. 00

国際調査報告の発送日 08.02.00

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
吉住 和之



4 P 9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

C (続き) . . . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	& JP, 8-024325, A & US, 5658592, A	31, 36-38
Y	JP, 6-87746, A (第一製薬株式会社) 29. 3月. 1994 (29. 03. 94) (ファミリーなし)	36-38



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

今村 正純

殿

あて名

〒 104-0031

東京都中央区京橋1丁目5番5号  
KRFビル5階 特許事務所サイクス

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]

発送日  
(日.月.年)

02.05.00

出願人又は代理人  
の書類記号

99342M

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P99/06016

国際出願日

(日.月.年) 29.10.99

優先日

(日.月.年) 30.10.98

国際特許分類 (IPC) Int. Cl. A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26,  
A61K31/47

出願人 (氏名又は名称)

第一製薬株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 28.02.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 P

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 6602

## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-23, 25, 26, 28, 29, 31, 33-38	有
	請求の範囲	24, 27, 30, 32	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-38	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-38	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

刊行物1: WO, 97/46260, A1 (第一製薬株式会社), 11. 12月. 1997  
(11. 12. 97) (本願が引用している文献)

刊行物2: JP, 8-85703, A (株式会社ディ・ディ・エス研究所), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96) (本願が引用している文献) 【0027】参照

刊行物3: EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD) 22. 5月. 1996 (22. 05. 96)

刊行物4: JP, 6-87746, A (第一製薬株式会社) 29. 3月. 1994 (29. 03. 94)

## 請求項1-23について

刊行物1には、カルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むDDS化合物が記載されており、刊行物2には、多糖化合物のキャリアー、臓器移行性を高めるためにリンカーを介してキャリアーに結合した糖、及び、キャリアーに担持する際、スペーサーとしてペプチド等を使用する薬剤から構成されるDDS化合物が記載されているので、刊行物2のキャリアーを刊行物1のカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールに代えて用いることは、当業者にとって容易であり、請求項1-23は進歩性を有さない。

## 請求項24-38について

1) 刊行物3には、酵素反応で主鎖が切断され得る分解性基 (アミノ酸または2~6量体のオリゴペプチド等) およびスペーサーを介して、薬剤 (抗癌剤、抗炎症剤等) が水膨潤性高分子ゲル (分子内にカルボキシル基を有する多糖類等) に固定された医療用高分子ゲル (薬剤徐放基材として経口投与も可) (【0030】参照) が記載されている。そして、当該刊行物の試験例3には、エラスターゼで処理した後の加水分解物であるマフェニドの量を、HPLCを用いて定量することも記載されているので、請求項24, 27, 30, 32は新規性を有さない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

2) DDS化合物自体の生体濃度の測定やDDS化合物中に導入された医薬化合物の残基の含有量測定は、経口投与用DDSの臨床使用に向けて研究開発を行う当業者が当然行うことである。これらの測定をDDS化合物の酵素分解で放出される薬物を測定する方法(刊行物3, 試験例3参照)により行うことも当業者には容易である。したがって、請求項25, 26は進歩性を有さない。

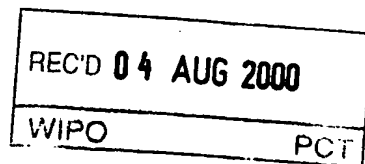
3) スペーサーとして用いられるペプチドや、ペプチドを切断するのに用いられる酵素などは、ターゲットとする臓器の種類などを考慮して、当業者が適宜選択すればよいものである。で、請求項28, 29, 33-35も進歩性を有さない。

4) 抗腫瘍剤として刊行物4に記載の(9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロー2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンを選択するのも特段困難なことではないので、請求項36-38も進歩性を有さない。

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 99342M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06016	国際出願日 (日.月.年) 29.10.99	優先日 (日.月.年) 30.10.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47		
出願人(氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.10.99	国際予備審査報告を作成した日 21.07.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  横尾 俊一 	4 P 9840  電話番号 03-3581-1101 内線 3490

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |   |       |        |                       |
|-------------------------------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| 明細書                                 | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 明細書                                 | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
|                                     |   |       |        |                       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの           |
| 請求の範囲                               | 第 | _____ | 項、     | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| 請求の範囲                               | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 請求の範囲                               | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
|                                     |   |       |        |                       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの           |
| 図面                                  | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 図面                                  | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
|                                     |   |       |        |                       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| 明細書の配列表の部分                          | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 明細書の配列表の部分                          | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲	1-23, 25, 26, 28, 29, 31, 33-38	有
請求の範囲	24, 27, 30, 32	無

進歩性 (IS)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-38	無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-38	無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

刊行物1: WO, 97/46260, A1 (第一製薬株式会社), 11. 12月. 1997  
(11. 12. 97) (本願が引用している文献)

刊行物2: JP, 8-85703, A (株式会社ディ・ディ・エス研究所), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96) (本願が引用している文献) 【0027】参照

刊行物3: EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD) 22. 5月. 1996 (22. 05. 96)

刊行物4: JP, 6-87746, A (第一製薬株式会社) 29. 3月. 1994 (29. 03. 94)

## 請求項1-23について

刊行物1には、カルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むDDS化合物が記載されており、刊行物2には、多糖化合物のキャリアー、臓器移行性を高めるためにリンカーを介してキャリアーに結合した糖、及び、キャリアーに担持する際、スぺーサーとしてペプチド等を使用する薬剤から構成されるDDS化合物が記載されているので、刊行物2のキャリアーを刊行物1のカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールに代えて用いることは、当業者にとって容易であり、請求項1-23は進歩性を有さない。

## 請求項24-38について

1) 刊行物3には、酵素反応で主鎖が切断され得る分解性基（アミノ酸または2～6量体のオリゴペプチド等）およびスぺーサーを介して、薬剤（抗癌剤、抗炎症剤等）が水膨潤性高分子ゲル（分子内にカルボキシル基を有する多糖類等）に固定された医療用高分子ゲル（薬剤徐放基材として経口投与も可）（【0030】参照）が記載されている。そして、当該刊行物の試験例3には、エラスターゼで処理した後の加水分解物であるマフェニドの量を、HPLCを用いて定量することも記載されているので、請求項24, 27, 30, 32は新規性を有さない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

2) DDS化合物自体の生体濃度の測定やDDS化合物中に導入された医薬化合物の残基の含有量測定は、経口投与用DDSの臨床使用に向けて研究開発を行う当業者が当然行うことである。これらの測定をDDS化合物の酵素分解で放出される薬物を測定する方法(刊行物3, 試験例3参照)により行うことも当業者には容易である。したがって、請求項25, 26は進歩性を有さない。

3) スペーサーとして用いられるペプチドや、ペプチドを切断するのに用いられる酵素などは、ターゲットとする臓器の種類などを考慮して、当業者が適宜選択すればよいものである。請求項28, 29, 33-35も進歩性を有さない。

4) 抗腫瘍剤として刊行物4に記載の(9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを選択するのも特段困難なことではないので、請求項36-38も進歩性を有さない。



## TENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
5th Floor, KRF Bldg., 5-5,  
Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku, Tokyo 104-0031  
JAPON

SIKs &amp; Co.

Date of mailing (day/month/year) 29 May 2000 (29.05.00)		
Applicant's or agent's file reference 99342M		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/06016	International filing date (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)	
Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)		
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KR, MA, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until **31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  Henrik Nyberg  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
5th Floor, KRF Bldg., 5-5,  
Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku, Tokyo 104-0031  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 23 December 1999 (23.12.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 99342M	
International application No. PCT/JP99/06016	International filing date (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An **asterisk(\*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
30 Octo 1998 (30.10.98)	10/310130	JP	20 Dece 1999 (20.12.99)
19 Nove 1998 (19.11.98)	10/329272	JP	20 Dece 1999 (20.12.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Taïeb Akremi <del>TA</del>  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

# TENT COOPERATION TREA

PCT

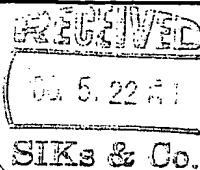
## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
5th Floor, KRF Bldg., 5-5,  
Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku, Tokyo 104-0031  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 May 2000 (11.05.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 99342M			
International application No. PCT/JP99/06016	International filing date (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)	
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al			

- Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,JP,KR,MA,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,  
GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,  
PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
- Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
11 May 2000 (11.05.00) under No. WO 00/25825

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

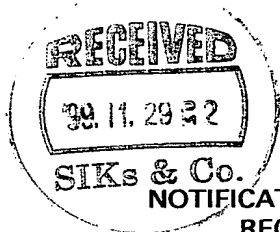
### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
5th Floor, KRF Bldg., 5-5,  
Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku, Tokyo 104-0031  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 99342M	International application No. PCT/JP99/06016

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (for all designated States except US)  
SUSAKI, Hiroshi et al (for US)

International filing date : 29 October 1999 (29.10.99)  
Priority date(s) claimed : 30 October 1998 (30.10.98)  
19 November 1998 (19.11.98)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 15 November 1999 (15.11.99)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM  
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG  
National : AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

**ATTENTION**

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Y. KUWAHARA Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



1/6

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年10月29日（29.10.1999）金曜日 10時10分10秒

99342M

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/RO/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	99342M
I	発明の名称	D D S 化合物及びその測定方法
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	第一製薬株式会社
II-4ja	名称	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
II-4en	Name	103-8234 日本国
II-5ja	あて名:	東京都 中央区
II-5en	Address:	日本橋 3 丁目 1 4 番 1 0 号 14-10, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku, Tokyo 103-8234 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	洲崎 浩
III-1-4ja	氏名(姓名)	SUSAKI, Hiroshi
III-1-4en	Name (LAST, First)	134-8630 日本国
III-1-5ja	あて名:	東京都 江戸川区
III-1-5en	Address:	北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内 c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年10月29日（29.10.1999）金曜日 10時10分10秒

99342M

III-2 III-2-1 III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja   III-2-5en   III-2-6 III-2-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  井上 和泓 INOUE, Kazuhiro 134-8630 日本国 東京都 江戸川区 北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内 c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3 III-3-1 III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja   III-3-5en   III-3-6 III-3-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  久我 洋 KUGA, Hiroshi 134-8630 日本国 東京都 江戸川区 北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内 c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-4 III-4-1 III-4-2 III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja   III-4-5en   III-4-6 III-4-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  池田 政浩 IKEDA, Masahiro 134-8630 日本国 東京都 江戸川区 北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内 c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan 日本国 JP 日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

99342M

原本(出願用) - 印刷日時 1999年10月29日 (29.10.1999) 金曜日 10時10分10秒

III-5 III-5-1 III-5-2 III-5-4ja III-5-4en III-5-5ja   III-5-5en   III-5-6 III-5-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  塩瀬 能伸 SHIOSE, Yoshinobu 134-8630 日本国 東京都 江戸川区 北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内 c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-6 III-6-1 III-6-2 III-6-4ja III-6-4en III-6-5ja   III-6-5en   III-6-6 III-6-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  是永 博 KORENAGA, Hiroshi 134-8630 日本国 東京都 江戸川区 北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内 c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan 日本国 JP 日本国 JP
IV-1  IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja  IV-1-2en  IV-1-3 IV-1-4	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  電話番号 ファクシミリ番号	代理人 (agent)  今村 正純 IMAMURA, Masazumi 104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan 03-3271-1331 03-3271-1410
IV-2  IV-2-1ja IV-2-1en	その他の代理人  氏名 Name(s)	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 塩澤 寿夫; 釜田 淳爾 SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

99342M

原本（出願用） - 印刷日時 1999年10月29日（29.10.1999）金曜日 10時10分10秒




V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ UG ZW <del>ト</del> 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である 他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国 である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締 約国になった国)	MA モロッコ Morocco
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日から 15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主 張	
VI-1-1	先の出願日	1998年10月30日 (30.10.1998)
VI-1-2	先の出願番号	特願平10-310130
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先権主 張	
VI-2-1	先の出願日	1998年11月19日 (19.11.1998)
VI-2-2	先の出願番号	特願平10-329272
VI-2-3	国名	日本国 JP
VI-3	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1, VI-2
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

99342M

原本（出願用） - 印刷日時 1999年10月29日（29.10.1999）金曜日 10時10分10秒

VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	6	-
VIII-2	明細書	48	-
VIII-3	請求の範囲	5	-
VIII-4	要約	1	99342m.txt
VIII-5	図面	6	-
VIII-7	合計	66	
	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	今村 正純	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

特許協力条約に基づく国際出願願書

99342M

原本（出願用） - 印刷日時 1999年10月29日（29.10.1999）金曜日 10時10分10秒

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

特許協力条約に基づく国際出願願書(願書付属書 -  
手数料計算用紙)

99342M

原本(出願用) - 印刷日時 1999年10月29日 (29.10.1999) 金曜日 10時10分10秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	受理官庁の日付印	
0-4	(付属書) この特許協力条約に基づく国際 出願願書付属書(様式 - PCT/RO/101(Annex))は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)
0-4-1		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	99342M
2	出願人	第一製薬株式会社
12	所定の手数料の計算	金額/係数 小計(JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒ 18,000
12-2	調査手数料 S	⇒ 77,000
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,800
12-4	30枚を越える用紙の枚数	36
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,300
12-6	合計の手数料 b2	46,800
12-7	b1 + b2 = B	101,600
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	82
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は10)	10
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	12,600
12-11	合計の指定手数料 D	126,000
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-16,900
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒ 210,700
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	2
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料	1,500
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒ 3,000
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒ 308,700
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	9 6 2 1 弁理士 今村正純
13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	9 2 6 3 弁理士 塩澤寿夫

13-1-3	出願人による言及 氏名(名称)	9 5 8 4 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。確認してください。
		Yellow! "追加する指定国"の欄を用いた指定がなされていますが、この欄を用いることなく、更新された最新のメンテナンステーブルを入手し使用することを推奨します。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません。
13-2-7	EASYによるチェック結果 手数料	Green? 使用されている料金表が最新のものであるかどうか、確認してください。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

## TENT COOPERATION TRE

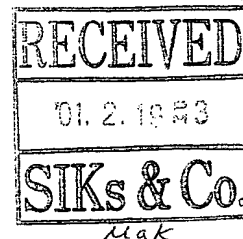
**PCT**  
**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL**  
**OF COPIES OF TRANSLATION**  
**OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY**  
**EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
 5th Floor, KRF Bldg., 5-5,  
 Kyobashi 1-chome  
 Chuo-ku, Tokyo 104-0031  
 JAPON



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 23 January 2001 (23.01.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 99342M	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/06016	<b>International filing date (day/month/year)</b> 29 October 1999 (29.10.99)
<b>Applicant</b> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Elliott Peretti  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



(51) 国際特許分類7 A61K 47/48, 47/30, 47/26, 31/47	A1	(11) 国際公開番号 WO00/25825
		(43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06016	(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1999年10月29日(29.10.99)		
(30) 優先権データ 特願平10/310130 1998年10月30日(30.10.98) JP 特願平10/329272 1998年11月19日(19.11.98) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 洲崎 浩(SUSAKI, Hiroshi)[JP/JP] 井上和泓(INOUE, Kazuhiro)[JP/JP] 久我 洋(KUGA, Hiroshi)[JP/JP] 池田政浩(IKEDA, Masahiro)[JP/JP] 塩瀬能伸(SHIOSE, Yoshinobu)[JP/JP] 是永 博(KORENAGA, Hiroshi)[JP/JP] 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)	添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME		
(54)発明の名称 DDS化合物及びその測定方法		
(57) Abstract A method for assaying a DDS compound containing a saccharide compound-modified carboxy C <sub>1-4</sub> alkyl dextran polyalcohol and a drug compound residue bonded to this carboxy C <sub>1-4</sub> alkyl dextran polyalcohol, or a DDS compound wherein a polymer carrier is bonded to a drug compound residue via a spacer containing 2 to 8 amino acids bonded together via peptide bonds, which involves the step of assaying a hydrolysate obtained by treating the DDS compound with peptidase.		

糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むDDS化合物、及びペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスパーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したDDS化合物の測定方法であって、該DDS化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	セリテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GE	グルジア	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MA	モロッコ	TD	チャード
BJ	ベナン	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CN	中国	IT	イタリア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	KE	ケニア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CY	キプロス	KG	キルギスタン	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KR	韓国	PL	ポーランド		
DK	デンマーク			PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## D D S 化合物及びその測定方法

## 技術分野

本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させた D D S 化合物（D D S：ドラッグ・デリバリ・システム）に関するものである。また、本発明は、高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させた D D S 化合物の測定方法に関するものである。

## 背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖化合物を高分子キャリアーとして用い、該高分子キャリアーに対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 W094/19376 号には、カルボキシル基を有す



る多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数1から8）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合したDDS化合物が開示されている。また、特公平7-84481号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入したDDS化合物が開示されている。

これらのDDS化合物（「薬物複合体」と呼ばれる場合もある）は、高分子キャリアーに結合された抗腫瘍剤を単独で用いた場合に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。本発明者らは、多糖化合物などの高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを1から8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合させることにより、抗腫瘍剤などの医薬化合物を目的組織に対して部位選択的に移行させることができるDDS化合物を提供している（国際公開W097/46260号）。また、カルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールが高分子キャリアーとして極めて優れた性質を有していることを見出し、カルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むDDS化合物を提供した（上記国際公開）。

その他、ポリアルコール化多糖化合物を高分子キャリアーとして用いたDDS化合物に関する技術については、「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・多糖化合物の血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第10回日本DDS学会講演要旨集, 279, 1994）；「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第9回日本薬物動態学会年会講演要旨集, 292, 1994）；第19回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集, D-9, 1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第12回コロイド・界面技術シンポジウム, 日本化学会, 講演要旨集, 51, 1995）などの報告がある。

多糖化合物などの高分子キャリアーの臓器指向性を高める方法として、例えば、糖修飾ポリグルタミン酸誘導体（特開平5-178986号公報）、糖修飾ポリリジン誘導体（特開平5-222187号公報）、ポリ-ε-置換-L-リジンのD-ガラクトピラノシ

ル-グルコン酸誘導体 (特開平 7-70311 号公報)、糖修飾ポリ- $\omega$ -置換-L-グルタミン酸誘導体 (特開平 7-228688 号公報)、リンカーを介して糖化合物を結合させた多糖化合物 (特開平 8-85703 号公報)、及びグルコシル-蛋白誘導体 (特開平 9-118699 号公報) などが知られている。しかしながら、従来、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして利用した DDS 化合物の臓器指向性を高める方法は報告されていない。

一方、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合した DDS 化合物を臨床で使用する場合には、DDS 化合物自体の血中濃度を正確に測定することが必要であり、また、適正な投与量を決定したり、製品のロット差を検定するためには、DDS 化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する必要がある。従来、DDS 化合物の血中濃度の測定や DDS 化合物の医薬化合物の残基の含有量測定は、医薬化合物の発する蛍光や UV 吸収を指標にして、DDS 化合物より医薬化合物またはこれにスペーサーの一部が結合した化合物を切り離すことなく、DDS 化合物自体を直接測定することにより行われている。また、DDS 化合物自体の NMR 測定による方法や、DDS 化合物を酸処理して生じる分解物を測定する方法も提案されている。

しかしながら、医薬化合物が酸に対して不安定である場合には、酸処理等による分解物の定量法を利用することはできず、NMR 測定による定量は精度が低いという問題がある。また、DDS 化合物に存在する医薬化合物の残基の UV 吸収は、高分子キャリアーやペプチドスペーサーから受ける影響により、医薬化合物自体に比べて極大波長がシフトしたりモル吸光係数が変化している場合があるため、DDS 化合物中に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に測定することは一般に困難である。さらに、生体に投与された組織中の DDS 化合物を NMR 測定による方法や UV 吸収により定量することは極めて困難である。

## 発明の開示

本発明の課題は、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むDDS化合物の臓器指向性(例えば肝臓への指向性など)を高める手段を提供し、上記の特徴を有するDDS化合物を提供することにある。

本発明の別の課題は、上記の特徴を有するDDS化合物の製造用原料として有用な多糖化合物を提供することにある。

本発明のさらに別の課題は、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したDDS化合物の測定方法を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、DDS化合物自体、又はDDS化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する方法を提供することにある。さらに具体的には、投与されたDDS化合物の血中濃度や組織内濃度を正確に定量することができ、あるいはDDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に定量可能な測定方法を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、糖化合物で修飾したカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いると、極めて臓器指向性の高いDDS化合物を製造することができ、特にガラクトースを結合させたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを含むDDS化合物は優れた肝臓指向性を有していることを見出した。

また、本発明者らは、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したDDS化合物をペプチダーゼで処理し、得られた加水分解物を測定することによって、DDS化合物の血中濃度やDDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に、かつ簡便に定量することができることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むDDS化合物を提供するものである。

この発明の好ましい態様によれば、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記DDS化合物；スペーサーが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸である上記DDS化合物；糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである上記DDS化合物；及び、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである上記DDS化合物が提供される。

また、本発明により、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるDDS化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる上記DDS化合物；及び、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができる上記DDS化合物が提供される。

さらに、本発明により、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスペーサーを介して結合したカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができるDDS化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる上記DDS化合物；及び、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリ

アルコールのカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基に 1 個のアミノ酸からなるスパーサー又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるスパーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる上記 D D S 化合物が提供される。

本発明のさらに好ましい態様によれば、糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である上記 D D S 化合物；カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである上記 D D S 化合物；カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記 D D S 化合物；ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01~1.0 である上記 D D S 化合物；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記 D D S 化合物；医薬化合物が(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記 D D S 化合物；及び肝臓癌治療剤である上記 D D S 化合物が提供される。

別の観点からは、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール；糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー；及び上記 D D S 化合物の製造に使用するための、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールが本発明により提供される。また、別の観点からは、上記 D D S 化合物の製造のための、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ

酸を含むスパーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したDDS化合物の測定方法であって、該DDS化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

この発明の好ましい態様によれば、生体試料中に含まれる該DDS化合物の濃度測定に用いる上記方法；該DDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる上記方法；該加水分解物が医薬化合物である上記方法；該加水分解物が医薬化合物の残基にスパーサーの一部が結合した化合物である上記方法；及び、スパーサーの一部がスパーサー由来の1個のアミノ酸である上記方法が提供される。

上記発明のさらに好ましい態様によれば、該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する高分子キャリアー、好ましくは多糖誘導体である上記方法；該高分子キャリアーがカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール、好ましくはカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記方法；カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする上記方法；該高分子キャリアーが糖化合物で修飾されたものである上記方法；該DDS化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記方法；スパーサーがN末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly- で表されるテトラペプチド又はN末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe- で表されるテトラペプチドである上記方法；スパーサーがN末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO- で表される基又はN末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO- で表される基（式中、Y'はp-フェニレン基を示す）である上記方法；ペプチダーゼが $\alpha$ -キモトリプシン又はパパインである上記方法；及び、医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記方法が提供される。

上記発明の特に好ましい態様では、上記方法はN末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はN末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C<sub>1-4</sub> アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合したDD S化合物の測定に用いることができ、ペプチダーゼとして $\alpha$ -キモトリプシンを用い、加水分解物として(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定することにより、上記DD S化合物又は上記DD S化合物に導入された上記抗腫瘍剤の含有量を定量することができる。

#### 図面の簡単な説明

- 第1図 本発明の方法(例4)で測定したDD S化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。
- 第2図 本発明の方法(例5)で測定したDD S化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。
- 第3図 糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のDD S化合物(例6)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。
- 第4図 糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のDD S化合物(例6)のGPCチャートを示す図である。
- 第5図 例6で製造したDD S化合物((C)及び(D))の肝臓への集積性を示す図である。
- 第6図 本発明のDD S化合物(例6(D))の紫外線吸収スペクトルを示す図である。
- 第7図 本発明のDD S化合物(例7)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。
- 第8図 本発明のDD S化合物(例9)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第9図 本発明のDDS化合物(例6(D))のGPCチャートを示す図である。

第10図 本発明のDDS化合物(例7)のGPCチャートを示す図である。

第11図 本発明のDDS化合物(例9)のGPCチャートを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のDDS化合物は、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むことを特徴としている。より具体的には、本発明のDDS化合物は、(1) 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介さずに結合している場合；及び(2) 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合している場合のいずれをも包含する。

糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合している場合の例としては、例えば、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが1個のアミノ酸からなるスパーサーで結合している場合、又はカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがペプチド結合した2から8個のアミノ酸からなるスパーサーを介して結合している場合や、ペプチド結合した2から8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに $-NH-Y-CO-$  [式中、Yは炭素数1から8個のアルキレン基又は $-C_6H_4-CH_2-O-$  ( $-C_6H_4-$ はフェニレン基を示し、該フェニレン基は1又は2個以上の置換基を有していてもよく、好ましくはp-フェニレン基である)で表される基を示す]で表される連結基が結合したスパーサーを介して結合している場合などを挙げることができる。本明細書において用いられる「修飾」という用語は、糖化合物とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとが直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合によって結合した状態を含めて最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味において



も限定的に解釈してはならない。

上記のD D S化合物に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造を意味している。もっとも、該医薬化合物の用途は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーとの結合に関与できる1又は2以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシ基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ基、スペーサーに存在する反応性官能基（例えば、ペプチドスペーサーを用いる場合には、そのN末端アミノ基若しくはC末端カルボキシ基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基）に結合していてもよい。また、本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

上記発明において、医薬化合物の残基とは、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーと医薬化合物の残基との結合が、医薬化合物中の反応性官能基とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が  $D-NH_2$ ,  $D-COOH$ ,  $D-COOR$ ,  $D-OH$ ,  $D-SH$ ,  $D-CONH_2$ ,  $D-NH-COOR$  ( $R$  は低級アルキル基等)で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ  $D-NH-$  ( $D-NH-CO-Q$  など),  $D-CO-$  ( $D-CO-NH-Q$ ,  $D-CO-O-Q$ ,  $D-CO-S-Q$  など),  $D-CO-$  ( $D-CO-NH-Q$ ,  $D-CO-O-Q$ ,  $D-CO-S-Q$  など),  $D-O-$  ( $D-O-CO-Q$ ,  $D-O-Q$  など),  $D-S-$  ( $D-S-CO-Q$ ,  $D-S-Q$  など),  $D-CONH-$  ( $D-CO-NH-CO-Q$  など),  $D-NH-CO-$  ( $D-NH-CO-O-Q$ ,  $D-NH-CO-NH-Q$  など)で表される（カッコ内はスペーサー又はカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合を

示し、Q はスペーサー及びカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールからそれぞれ反応性官能基及びカルボキシル基を除いた残りの部分構造を示す)。もともと、スペーサー又はカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラステチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン等）などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

医薬化合物の残基とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとを結合するスペーサーとして、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸からなるスペーサーを用いる場合には、該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

好ましいスペーサーは2から6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 $\alpha$ -アミノ酸のほか、 $\beta$ -アラニン、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸などを用いてもよい。

このような $\alpha$ -アミノ酸以外のアミノ酸は、スパーサー中で多糖化合物に近接した位置に配置されることが好ましい。

例えばオリゴペプチドスパーサーを用いる場合の結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基にスパーサーのN末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスパーサーのC末端を結合することできる。また、例えば、ペプチドスパーサーの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基の $\alpha$ -アミノ基及び $\epsilon$ -アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスパーサーの両末端がN末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スパーサー中に1個又は2個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基など）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がN末端のスパーサー及び両末端がC末端のスパーサーを利用してもよい。

オリゴペプチドからなるスパーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スパーサーが  $-X-Z-$  で表されるジペプチドの残基（X は疎水性アミノ酸の残基を示し、Z は親水性アミノ酸の残基を示し、 $-X-Z-$  は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスパーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スパーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば $-X-Z-X-Z-$ 、 $-X-Z-X-Z-X-Z-$ など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスパーサーを用いると、スパーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位

において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離する。従って、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のDDS化合物の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、濃度に依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機構、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例を以下の表に示すが、DDS化合物に必要に応じて用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、スペーサーを利用すべきか否かの選択、あるいはスペーサーを用いる場合にその種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したDDS化合物のWalker 256担癌ラットに対する薬効の発現程度、またはWalker 256担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

表 1

(a) 遊離速度が大きいスベーター

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスベーター

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスベーター

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスベーター

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

本発明のDDS化合物は、高分子キャリアーとして、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを有することを特徴としている。本発明のDDS化合物におけるカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。

カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、 $\alpha$ -D-1,6-結合を任意の割合で含んでもよい。例えば、 $\alpha$ -D-1,6-結合の割合が85%以上、90%以上、又は95%以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば1,000程度から2,000,000程度のもの、好ましくは3,000程度から800,000程度のものを用いることができる。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル基を構成する  $C_{1-4}$  アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の  $C_{1-4}$  アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -クロル酪酸、 $\beta$ -クロル酪酸、 $\gamma$ -クロル酪酸などのハロゲン化  $C_{1-4}$  アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部

分的又は完全にカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化することにより行うことができる。

例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒(例えば、水、 $N,N$ -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)に溶解し、塩基(例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等)の存在下にハロゲン化  $C_{1-4}$  アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化  $C_{1-4}$  アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの糖残基に対するカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、 $0.01\sim 2.0$  の範囲、好ましくは  $0.1\sim 1.0$  の範囲である。

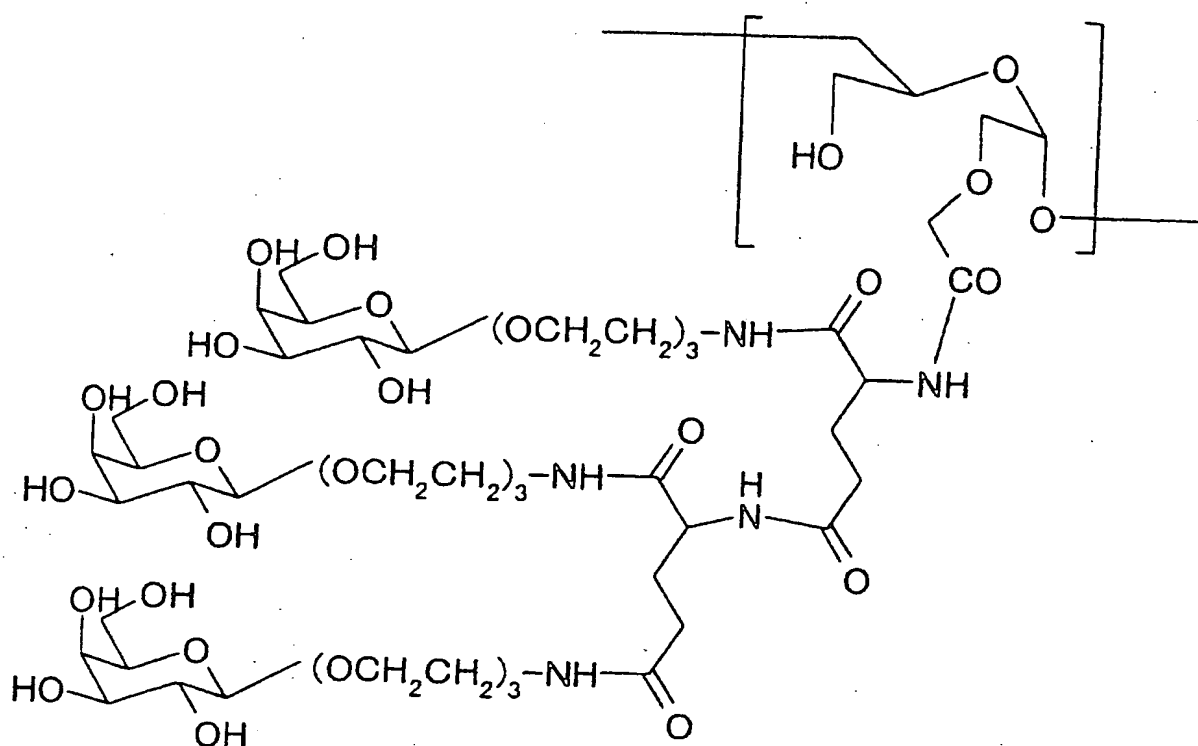
カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを修飾する糖化合物の種類は特に限定されず、DDS化合物が指向すべき臓器の種類や体内動態などの条件に応じて当業者が適宜選択可能である。糖化合物としては単糖類若しくはオリゴ糖類、又はそれらの誘導体のいずれを用いてもよい。また、糖化合物とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとの結合の種類は特に限定されない。糖化合物とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとが、例えば、 $0-\alpha$ -グリコシド結合又は  $0-\beta$ -グリコシド結合などにより直接結合していてもよく、あるいは適宜のリンカーを介して両者が結合していてもよい。本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、糖化合物残基とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとの結合に用いられるいかなるものも包含するように、最も広義に解釈する必要がある。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに対する糖化合物の導入量(置換度)は特に限定されず、糖化合物の種類、所望の指向性の程度、医薬化合物の種類など種々の条件によって適宜選択可能であるが、一般的には、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり  $0.01\sim 1.0$  程度である。

リンカーを用いる場合、リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、

$-O-(CH_2)_n-NH-$  ( $n$ は1から16の整数) 又は  $-(O-CH_2CH_2)_m-NH-$  ( $m$ は1から10の整数) で表されるリンカーを利用することが好ましい。これらのリンカーのO末端又はN末端、好ましくはO末端を糖化合物にO- $\alpha$ -グリコシド結合又はO- $\beta$ -グリコシド結合で結合し、他端をカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合させることにより、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することが可能である。

また、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用いることにより、クラスター修飾体を製造することもできる。クラスター修飾体は、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対してクラスター修飾に適するリンカーを用いて糖化合物を房状に結合させた化合物であり、その具体的手段は、例えば、特許第2774417号明細書、特許第2774429号明細書、又は *Biol. Pharm. Bull.*, 20, pp.259-266, 1997 などに記載されている。クラスター修飾体は複数個の糖化合物を一定の空間内に配置するために、レセプターとの親和性が高まり、優れた臓器指向性を発揮できるという特徴がある。本発明のDDS化合物におけるクラスター修飾の一例を下記に示す(下記の構造式では、クラスター修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール分子の部分構造を示してあり、医薬化合物の残基は省略してある)。もっとも、本発明のDDS化合物に利用可能なクラスター修飾方法は下記の具体例に限定されることはなく、当業者が適宜の手段を選択できることは言うまでもない。





単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸などのヘキソース；ガラクトサミン、グルコサミンなどのヘキソサミン；リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロースなどのペントースなどを挙げることができる。これらの誘導体として、例えば、N-又はO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、硫酸エステル、リン酸エステルなどを用いてもよい。単糖類の誘導体として、より具体的には、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-3-リン酸、6-O-ベンゾイルグルコース、6-O-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、2-N-ベンジルグルコサミンなどを挙げることができる。オリゴ糖類としては、例えば、上記の単糖類又はそれらの誘導体から構成される直鎖状又は分枝鎖状のヘテロオリゴ糖又はホモオリゴ糖を用いることができる。より具体的には、シュークロース、シアリルルイスA、シアリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスXなどを用いることができる。

これらのうち、肝臓指向性を高める糖化合物としては、ガラクトース若しくはガラクトサミン又はその誘導体、あるいはガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを非還元末端側に有するオリゴ糖（例えばラクトース）が好ましく、特にガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンが好ましい。

本発明のDD S化合物の製造方法は特に限定されないが、以下に一般的な製造方法を示す。また、その一例を本明細書の実施例に具体的かつ詳細に示した。当業者は、下記の一般的説明及び実施例に記載された製造方法を参照しつつ、製造原料、反応試薬、及び反応条件などを適宜選択し、必要に応じてそれらの方法に修飾や改変を加えることにより、本発明に包含されるDD S化合物を容易に製造することが可能である。一般的には、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを適宜の方法に従って糖化合物で修飾し、該修飾体を医薬化合物の残基又は医薬化合物に結合したスペーサーと反応させることにより、本発明のDD S化合物を製造することができる。通常は、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールをナトリウム塩又はカリウム塩などのアルカリ金属塩の形態の水溶液として調製し、糖化合物の修飾及び医薬化合物（又は医薬化合物に結合したスペーサー）との反応を水中、又は含水有機溶媒中で行うことができる。

あるいは、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを有機アミン塩の形態に変換し、その後の反応を実質的に水を含まない有機溶媒中で行うことも可能である。有機アミンの塩としては、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリエタノールアミンなどの脂肪族アミン類の塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジンなどの脂環式又は芳香族アミン類の塩、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウムなどの四級アンモニウム塩などを用いることができる。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのナトリウム塩から有機アミンの塩への変換は、イオン交換樹脂などを用いて行うことができる。例えば、

カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、H<sup>+</sup>型) 樹脂を充填したカラムに付して水で溶出した後、トリエチルアミンなどの有機アミンを添加して凍結乾燥することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、トリエチルアンモニウム型の樹脂を通過させることによって一工程で変換を行うことも可能である。

医薬化合物自体とカルボキシ C<sub>1-4</sub> アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合、又は医薬化合物を結合させたスペーサーとカルボキシ C<sub>1-4</sub> アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はスペーサーの反応性アミノ基（ペプチドスペーサーではN末端アミノ基など）とカルボキシ C<sub>1-4</sub> アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを、酸アミド結合させればよい。もっとも、スペーサーとカルボキシ C<sub>1-4</sub> アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や1又は2以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、ペプチドスペーサーのC末端カルボキシル基又は医薬化合物のカルボキシル基とカルボキシ C<sub>1-4</sub> アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はペプチドスペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) のような N,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド(EDAPC) 等のカルボジイミド誘導体、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (EEDQ) などを用いることができる。この場合、必要に応じて 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾ

ール誘導体を加えてもよい。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

反応を非水系で行う場合の溶媒としては、実質的に水を含まない有機溶媒であって、反応種（糖化合物で修飾されたカルボキシメチルデキストランポリアルコールの有機アミンの塩及び医薬化合物又は医薬化合物を結合させたスパーサーなど）を溶解することができるものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトアミド、N-メチルピロリドン、スルホランなどを用いることが好適である。糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに導入される医薬化合物の残基の量は特に限定されないが、医薬化合物の残基の種類、並びにDDS化合物の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1 ~ 30 重量%、好ましくは 2~15 重量%程度の範囲を選択することができる。医薬化合物として特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤を用いる場合の導入量は、例えば 1~15 重量%、好ましくは 4~8 重量%程度である。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに導入された医薬化合物の残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

例えば、医薬化合物として特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤を用いる場合、この医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えば pH3 程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えば pH10 程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入したDDS化合物は同等の抗腫瘍効果を有しているが、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと上記医薬化合物を結合させたスパーサー（例えばオリゴペプチドスパーサー）とを反応させる場合に開環型の反応種が反応系に存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスパーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行し、著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一なDDS化合物が得られない場合がある。このような副反応は、

平衡が達成されない非水系において反応種として閉環体を用いることにより回避することができる。

本発明のDDS化合物は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。また、本発明のDDS化合物は優れた血管透過性を有している。腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプターゼ）が発現されているため、オリゴペプチドからなるスペーサーを有するDDS化合物はスペーサー部分で容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が細胞内に移行して薬効を発揮するか、または標的細胞の糖を認識するレセプターを介してDDS化合物が細胞内に取り込まれ、プロテアーゼにより遊離した薬物が薬効を発揮する。

また、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールは生体内、例えば肝臓、脾臓、又は骨髄などで異物高分子として認識される程度が低い。このため、これらの臓器への移行性が低く、一方、糖化合物の種類に応じて対応の糖レセプターが豊富な臓器には高濃度で分布するという特徴がある。例えば、ガラクトースで修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを有する本発明のDDS化合物は、肝臓に対して優れた指向性を有している。従って、医薬化合物として抗腫瘍剤を結合したDDS化合物は、肝臓癌の治療に有用である。

本発明のDDS化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、このような医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができ、上記製剤は医薬組成物として調製することができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物の残基を構成する医薬化合物の投与量、DDS化合物中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定す

べきである。例えば、特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤の残基が約 6 重量% 程度の割合で導入された DDS 化合物を投与する場合には、非経口投与の場合には、一般に一日あたり体表面積  $1 \text{ m}^2$  につき約 0.1~100 mg 程度、好ましくは約 1~30 mg の範囲で一回投与し、3~4 週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した DDS 化合物の測定方法であって、該 DDS 化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性などを目的として行われる測定を含めて、最も広義に解釈する必要があるが、好ましくは定量を意味している。本発明の測定方法の対象となる DDS 化合物は、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した化合物であり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーとしては、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸のみからなるスペーサーのほか、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに  $-\text{NH}-\text{Y}-\text{CO}-$  [式中、Y は炭素数 1 から 8 個のアルキレン基又は  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-$  ( $-\text{C}_6\text{H}_4-$  はフェニレン基を示し、該フェニレン基は 1 又は 2 個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは p-フェニレン基である) で表される基を示す] で表される連結基が結合したスペーサーなどを挙げることができる。本発明の測定方法は、例えば、血液や体液などの生体試料に含まれる DDS 化合物自体の濃度を測定するために用いることができる。また、本発明の方法は、DDS 化合物に導入された医薬化合物の残基の導入量 (例えば、DDS 化合物全重量に対する医薬化合物の残基の重量% など) を測定するために用いることができる。

本発明の方法の測定対象である DDS 化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味は上記に説明したものと同義であり、医薬化合物としては、スペーサーとの結

合に関与できる 1 又は 2 以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、スペーサーの N 末端アミノ基若しくは C 末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

医薬化合物の残基の具体例は、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記 DDS 化合物について説明したとおりであり、好適に用いることができる医薬化合物の残基も同様である。

本発明の方法の測定対象である DDS 化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味はスペーサーを介して高分子キャリアーと結合するが、好ましいスペーサーは、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基、又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに  $-NH-Y'-CH_2-O-CO-$ （式中、 $Y'$  は p-フェニレン基を示す）で表される連結基が結合したスペーサーであり、スペーサーを構成するアミノ酸の種類、スペーサーの結合方向、アミノ酸配列、具体例などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドスペーサーを介して結合した上記 DDS 化合物について説明したものと同様である。

本発明の方法の測定対象である DDS 化合物を構成する高分子キャリアーとしては、例えば、多糖誘導体のほか、合成高分子などを用いることができる。多糖誘導体及び合成高分子としては、生体に対して実質的に毒性を示さず、薬物担体として作用できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、DDS 化合物の製造に従来より用いられている多糖誘導体及び合成高分子はいずれも高分子キャリアーとして利用可能である。例えば、カルボキシル基を有する多糖誘導体を好適に使用でき、ポリアルコール化多糖誘導体は特に好適に使用できる。また、合成高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール類；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、若しくはポリリジンなどのポリアミノ酸類；または

N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド誘導体などのポリビニル化合物の誘導体を挙げることができる。

より具体的には、カルボキシル基を有する多糖誘導体としては、例えば、多糖類又はそれらを化学的若しくは生物学的に修飾した誘導体を用いることができ、好ましくは分子中にカルボキシル基を有するものを用いることができる。分子中にカルボキシル基を有する高分子キャリアーの例としては、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなどの多糖類のほか、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラバン、マンノグルカン、キトサンなどの多糖の一部又は全部の水酸基に対してカルボキシル基を有する官能基を導入したものなどを用いることができる。例えば、水酸基をカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化したものや、水酸基に多塩基酸の一のカルボキシル基をエステル結合させたものなどを好適に用いることができる。また、上記の多糖類をポリアルコール化した後に、カルボキシル基を有する官能基を導入したものを用いてもよい。

カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いたDDS化合物は本発明の方法の特に好適な測定対象である。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度、製造に用いるデキストランの種類、及び製造方法などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合した上記DDS化合物について説明したものと同様である。

また、高分子キャリアーとして糖化合物で修飾された高分子キャリアーを用いたDDS化合物も本発明の測定方法の好適な対象である。例えば、糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールなどを高分子キャリアーとして好適に用いることができる。高分子キャリアーを糖化合物で修飾する方法や糖化合物の種類などは、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の測定方法の対象は、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用い



て製造されたDDS化合物（いわゆるクラスター修飾体）であってもよい。クラスター修飾の概念は、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の方法は、上記のDDS化合物を測定するにあたり、DDS化合物にペプチダーゼを作用させて得られる加水分解物を測定することを特徴としている。ペプチダーゼとしては、DDS化合物のスペーサーに含まれるオリゴペプチド部分（2から8個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチド部分）を加水分解することができるものであれば、その種類は特に限定されない。例えば、スブチリシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、タイプIVコラゲナーゼ、ペプシン、サーモリシン、パパイン、エラスターゼなどを用いることができるが、これらのうち、 $\alpha$ -キモトリプシン又はパパインが好ましい。

加水分解物の種類は特に限定されないが、紫外線吸収スペクトル、蛍光スペクトルなどの通常の分光学的手法により検出可能であることが望ましい。通常は、加水分解物として、医薬化合物自体のほか、スペーサーの一部が残存して医薬化合物の残基に結合している化合物、例えばスペーサー由来の1個のアミノ酸が結合した医薬化合物、スペーサー由来の2から8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドが結合した医薬化合物、又は $-NH-Y-CO-$  [式中、Yは炭素数1から8個のアルキレン基又は $-C_6H_4-CH_2-O-$  ( $-C_6H_4-$ はフェニレン基を示し、該フェニレン基は1又は2個以上の置換基を有していてもよく、好ましくはp-フェニレン基である) で表される基を示す] で表される連結基を介してスペーサー由来の1個のアミノ酸若しくは上記オリゴペプチドが結合した医薬化合物などを測定することができる。また、上記の加水分解物においては、医薬化合物の反応性官能基の一部又は全部が加水分解を受けていてもよい。DDS化合物の種類に応じて適宜のペプチダーゼを選択することにより、所望の加水分解物を測定することが可能になる。

測定のための試料としては、DDS化合物を投与した動物（ヒトを含む）から分離された血液、リンパ液、唾液、尿、糞、摘出組織などの生体試料のほか、DDS化合物の水溶液、又は実質的に酵素反応を阻害しない水性有機溶媒の溶液な

どを用いることができる。各種のペプチダーゼについて好適な反応条件が当業界で知られており、当業者は、ペプチダーゼの種類に応じて適宜の反応条件、例えば、基質濃度、pH、緩衝液、反応温度、反応時間などを容易に選択することができる。通常は、上記の試料を必要に応じてホモジュネートや脱蛋白質などの前処理に付した後、DDS化合物が所望の基質濃度となるように希釈した反応液にペプチダーゼを添加し、DDS化合物が完全に加水分解されるまで反応を継続すればよい。

加水分解物を測定する方法は特に限定されないが、DDS化合物の定量、又は医薬化合物の導入量の定量を行う場合には、加水分解物の性質に応じて、紫外線吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定など、通常の分光学的手法を単独で又は複数組み合わせる用いることが望ましい。また、高速液体クロマトグラフィーなどの分離操作を適宜組み合わせる測定を行ってもよい。予め測定系において検量線を作成することにより、精度よく定量を行うことが可能になる。なお、本明細書の実施例には、本発明の方法の代表例が具体的かつ詳細に説明されているので、当業者は、上記の一般的説明及び実施例の具体的説明に基づいて、必要に応じてそれらに適宜の改変ないし修飾を加えることにより、本発明の方法を容易に実施できる。

#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

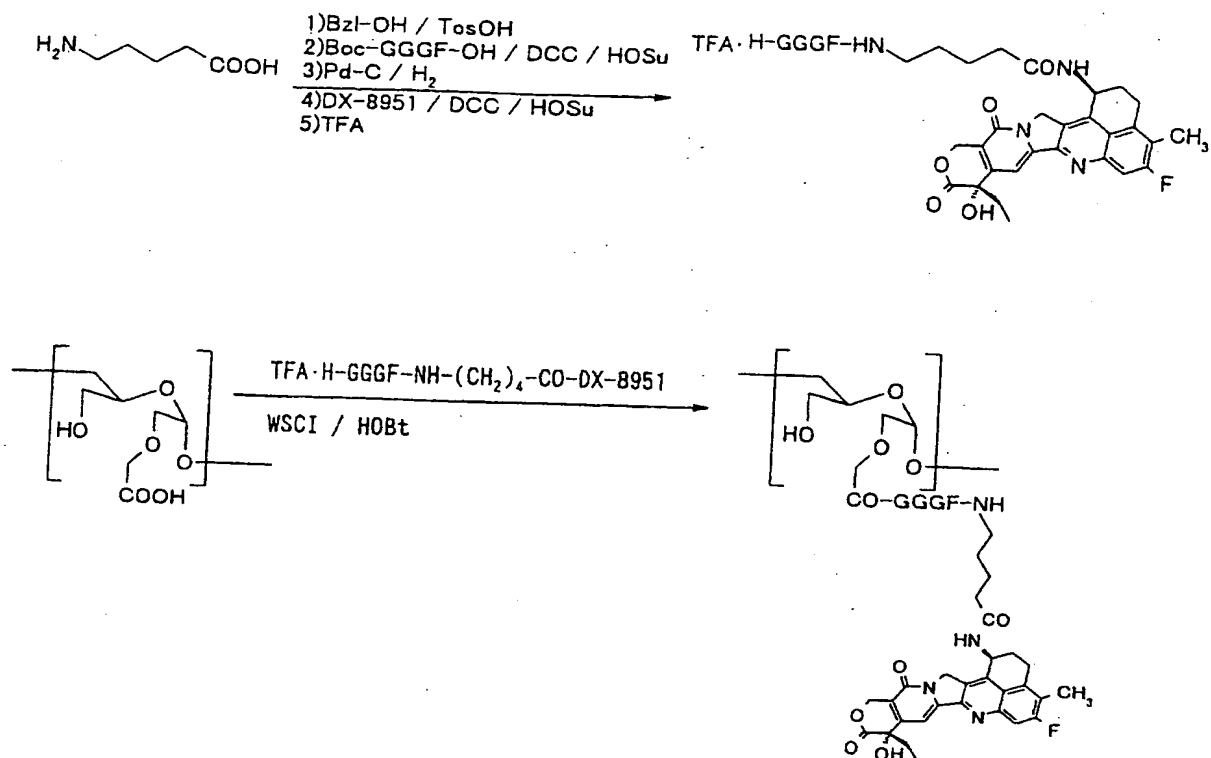
##### 例 1

高分子キャリアーであるカルボキシメチルデキストランポリアルコール（以下CM-Dex-PA 又は CM デキストランポリアルコールなどの略号を用いる場合がある）と抗腫瘍剤（特開平6-87746号公報の請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：以下、

実施例において DX-8951 と略す。) とが、-Gly-Gly-Phe-Gly- (オリゴペプチドは N 末端側からの配列として示す。以下、同様である) からで表されるテトラペプチドスパーサーを介して結合した DDS 化合物(化合物 1)を、国際公開 W097/46260 号の実施例 15 に記載の方法に準じて製造した。CM-Dex-PA としては、平均分子量 228K、カルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4 のものを用いた。

蒸留水にて 400  $\mu$ g/ml に調製した上記 DDS 化合物 10  $\mu$ l を 180  $\mu$ l の Britton Robinson 緩衝液 (pH6.0) に添加し、さらに蒸留水で 10mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液を 10  $\mu$ l 添加した。反応液を 40°C で 2 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 200  $\mu$ l 加え、遊離した加水分解物 (スパーサー由来のグリシンが DX-8951 のアミノ基にペプチド結合した化合物: 国際公開 W097/46260 号の実施例 50 に記載の化合物、以下、G-DX-8951 と略す) を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6  $\times$  100 mm; 3.5  $\mu$ m, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール: アセトニトリル=1:2) を 36.5% 含有する 0.1M 酢酸ナトリウム (pH5.0) にて溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を検出した。この結果、上記 DDS 化合物の DX-8951 含有量は 5.7% であった。一方、DX-8951 の UV 吸収 (366 nm) を指標とし、分光光度計を用いて上記 DDS 化合物の DX-8951 含有量を算出したところ 4.9% であった。

## 例 2



CM-Dex-PAとDX-8951とが-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-で表されるスペーサーを介して結合したDDS化合物(化合物2)を下記のようにして製造した。5-アミノペンタノイックアシッド(1.0 g)とp-トルエンスルホン酸(1.95 g)とベンジルアルコール(5 ml)をトルエン(50 ml)中、140°CでDean-Starkを用いて、生成する水を除去しながら5時間反応させた。反応液を濃縮し、得られた残さにエーテルを加えて固化した。得られた固体を濾過し、エーテルで洗浄して乾燥させ、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩を2.9g得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (575 mg)、HOSu (182 mg)、及びDCC (326 mg)をDMF (20 ml)に溶解し、30分間攪拌した。この溶液に5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩 (500 mg)とトリエチルアミン (0.184 ml)をDMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で3日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィー (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOBzlを380 mg得た (Bzlはベンジル基を示す)。Boc-Gly-Gly-Gly-

Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOBzl (380 mg) を 50% 含水メタノール (20 ml) に溶かし、5% Pd-C (50% 含水)(300 mg) を加え、水素常圧下、1 晩攪拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH を 330 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH (150 mg) と DCC (70 mg) と HOSu (40 mg) を DMF に溶かし、30 分攪拌した。この溶液に、DX-8951 (160 mg) とトリエチルアミン (0.040 ml) を DMF に溶かした溶液を加え、室温で 1 晩攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=20:1) で精製して、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 を 110 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 (110 mg) を TFA (2 ml) に溶かし、1 時間反応させた後、反応液を濃縮し、得られた残査にエーテルを加え固化させた。上澄みを除去し、固体を乾燥し、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩を 100mg 得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.45-8.55 (m, 2H), 8.28-8.35 (m, 2H), 7.95-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.70-7.75 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 5H), 7.15-7.25 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.50-4.60 (m, 1H), 3.55-3.95 (m, 7H), 3.00-3.25 (m, 5H), 2.75-2.85 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.15-2.25 (m, 4H), 1.86-2.00 (m, 2H), 1.55-1.65 (m, 2H), 1.45-1.55 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.35Hz)

特開平 8-144421 号公報の実施例 13 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 337K、カルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4 の CM-Dex-PA(350mg) を水 (10ml) に溶解した。この溶液に、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (50 mg) をメタノール (10 ml) に溶かした溶液を加え、さらに、HOBt (7 mg) をメタノール (5 ml) に溶かした溶液を加えた。反応液の pH を 7.0 に調整して水溶性カルボジイミド (10mg) を加え、14 時間攪拌した。さらに、水溶性カルボジイミド (10mg) を加え、2 時間攪拌後に、水溶性カルボジイミド (10mg) を加え、2 時間攪拌した。反応液

を超純水で希釈し、限外ろ過膜 (50K) を用いて低分子を除去し、凍結乾燥し、得られた粉体を 3M 食塩水に溶かし、エタノールに滴下し、析出した固体を遠心分離によって分離した。上澄みを除去し、固体を再度水に溶解し、限外濾過膜 (50K) で低分子を除去した後、 $0.22\mu\text{m}$  のフィルターを通して凍結乾燥し、目的物を 280mg 得た。

蒸留水にて  $2.63\text{ mg/ml}$  に調製した上記 D D S 化合物の溶液  $10\mu\text{l}$  に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて  $2\text{ mg/ml}$  に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液、又は Tris-HCl (pH 9) にて  $2\text{ mg/ml}$  に調製したサブチリシン A 溶液を  $490\mu\text{l}$  添加した。この反応液を  $40^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した  $0.5\text{ N HCl}$  溶液を  $500\mu\text{l}$  加え、遊離した加水分解物  $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{DX-8951}]$  を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 ( $4.6 \times 100\text{ mm}$ ;  $3.5\mu\text{m}$ , Watars 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) を 32% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex.  $375\text{ nm}$  及び Em.  $445\text{ nm}$ ) により加水分解物を検出した。この結果、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{DX-8951}$  は約 4.8 分に溶出された。 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{DX-8951}$  を検量線に用いて上記 D D S 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ 3.2% と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 D D S 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 2.9% と算出された。

### 例 3

① サブチリシン A ( $0.1\text{ M Tris-HCl pH } 9.0$ ) ②  $\alpha$ -キモトリプシン ( $0.1\text{ M Tris-HCl pH } 8.0$ )、③ サーモリシン ( $0.1\text{ M Tris-HCl}/1\text{ mM CaCl}_2\text{ pH } 9.0$ ) を用いて、例 1 で製造した D D S 化合物 (化合物 1) の DX-8951 含有量を測定した。各酵素用の緩衝液  $180\mu\text{l}$  に  $400\mu\text{g/ml}$  に調製した化合物 1 を  $10\mu\text{l}$  添加した (最終濃度 :  $20\mu\text{g/ml}$ )。この混合物に各緩衝液で  $100\text{ mg/ml}$  に調製した各酵素を  $10\mu\text{l}$  添加した後 (最終濃度 :  $5\text{ mg/ml}$ )、 $40^\circ\text{C}$  で 3 時間反応させた。反応後、50% アセトニトリルを含有する  $0.5\text{ N HCl}$  溶液を  $200\mu\text{l}$  添加し、その  $10\mu\text{l}$  を HPLC

で分析した。Symmetry C18 (4.6×250 mm) カラムを用い、有機溶媒（アセトニトリル：メタノール=2:1）を 31% 含有する 0.1 M AcONa 緩衝液 pH 5.0 で溶出した。蛍光スペクトル測定（Ex. 375 nm 及び Em. 445 nm）により加水分解物を測定し、G-DX-8951、DX-8951、及び化合物 1 のスパーサー由来のフェニルアラニン-グリシンが結合した DX-8951 (FG-DX-8951) をそれぞれ 2 nmol/ml 含有する溶液を用いて作成した検量線により酵素反応溶液中の加水分解物を定量した。この結果、サブチリシン A と  $\alpha$ -キモトリプシンは上記条件によりそれぞれ化合物 1 から G-DX-8951 を 100% 遊離した。また、サーモリシンは FG-DX-8951 を 100% 遊離した。

#### 例 4

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量 : 5.2%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で腹腔内投与した。投与後、経時的 (2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25  $\mu$ l に 80% メタノール水を 100  $\mu$ l 添加した後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清の 25  $\mu$ l に 0.1 M Tris-HCl pH 8.5/0.1 M  $\text{CaCl}_2$  を用いて 2 mg/ml に調製したサーモリシン溶液を 225  $\mu$ l 添加し、50°C で 1 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250  $\mu$ l 添加し、その 20  $\mu$ l を HPLC 分析した。カラムとして Symmetry C18 (4.6×100 mm) を用い、メタノールとアセトニトリルの混液 (1:2) を 41% 含む 0.1 M AcONa (pH 5) 溶液にて溶出し、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm、Em. 445 nm) により加水分解物を検出した。その結果、10 mg/kg 投与では、腹水中の化合物 1 の濃度は時間の経過とともに減少したが、血中濃度は投与後次第に上昇して 24 時間で最大値となり、その後、腹水濃度とほぼ同程度に推移した (図 1)。2.5 mg/kg 投与時の腹水及び血中濃度の推移は 10 mg/kg の場合と同様であった。

## 例 5

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量 : 6.6%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で静脈内投与した (1 群 3 匹)。投与後、経時的 (5 分、30 分、2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm、10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25  $\mu$ l に Britton Robinson Buffer (pH 6) を用いて 2 mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液を 225  $\mu$ l 添加し、40°C で 2 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250  $\mu$ l 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 10  $\mu$ l を HPLC 分析した。HPLC 分析で得られた G-DX-8951 濃度、及び用いた化合物 1 の DX-8951 含有量から推定される化合物 1 の濃度を算出した。HPLC 分析は例 4 の条件に従って行った。この結果、10 mg/kg 投与時には、血中の化合物 1 濃度は時間の経過とともに減少した。腹水での化合物 1 の濃度は投与後次第に上昇し、48 時間で血中濃度とほぼ同程度になった (図 2)。2.5 mg/kg 投与時における化合物 1 の腹水中及び血中の濃度推移は、10 mg/kg の場合と同様であった。

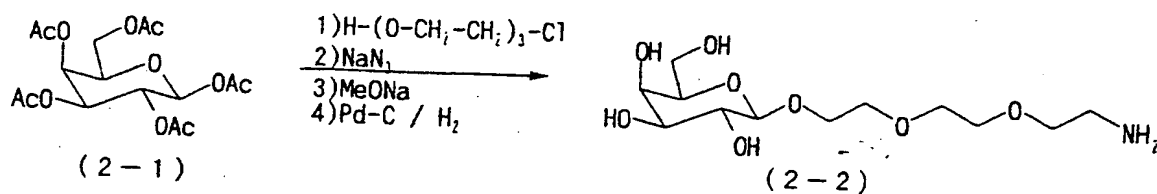
## 例 6

糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する DDS 化合物を以下のようにして製造した。下記のスキームにおいて、糖鎖の構成単位としてカルボキシメチル基が導入された 1 個又は 2 個の構成単位を例示的に記載したが、実施例に記載した DDS 化合物のカルボキシメチルデキストランポリアルコール部分は、上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチ



ルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H<sup>+</sup>) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を s(mg)、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を a(ml)、0.1N 塩酸の滴定量を b(ml)とし、カルボキシメチル化度を  $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$  の式により求めた。また、薬物の導入量(重量%)は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析(362 nm 付近)から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った(カラム: TSK gel G4000 PW<sub>XL</sub>、溶離液: 0.1M NaCl、流速: 0.8 ml/min、カラム温度: 40°C)。

(A)化合物 2-2 の合成



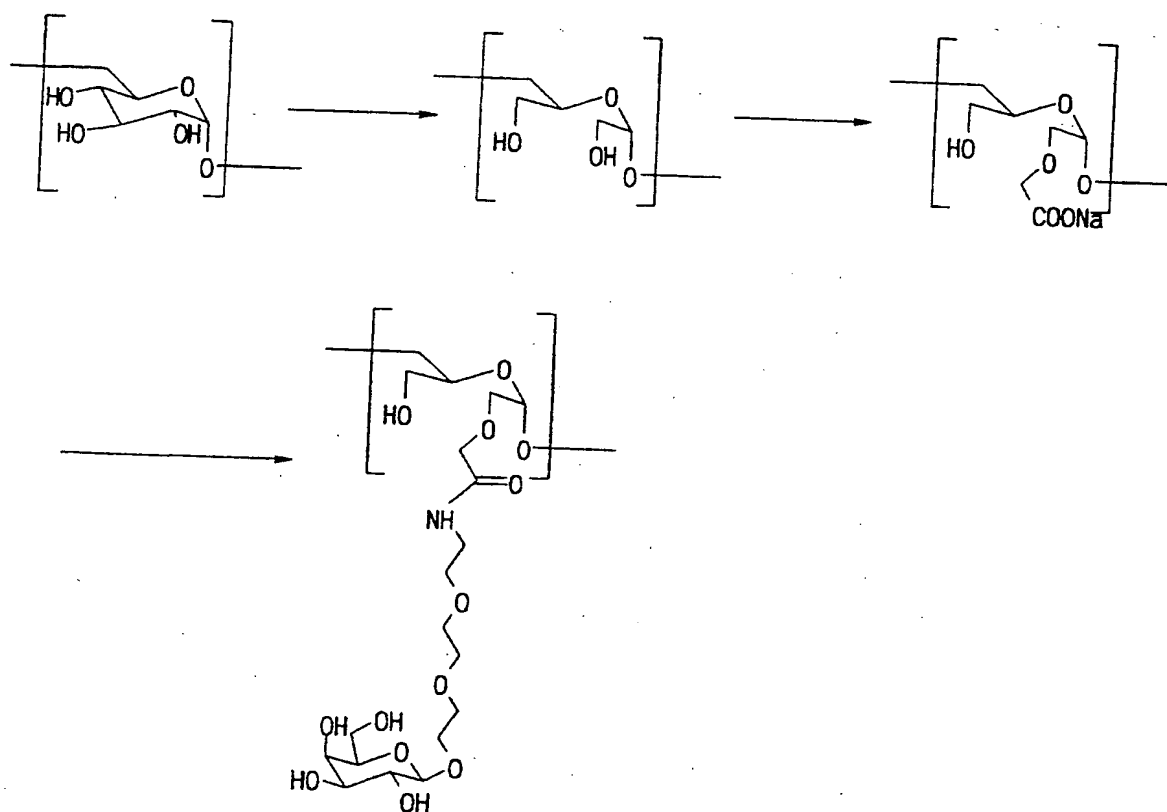
化合物 2-1 (5.0 g)と 2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール(3.75 ml)をジクロロメタン(75 ml)に溶かし、3 フッ化ホウ素エーテル錯体(7.7 g)を加え、5 時間攪拌した。反応液をジクロロメタン(100 ml)で希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル 2:1)で精製し、クロル体を 3.3g 得た。得られたクロル体(3.3 g)と NaN<sub>3</sub>(2.0 g)を DMF(15 ml)中で 60°Cで 2 日間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルと水の混合液に溶かし、有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去し、溶媒を留去し、アジド体を 2.8g 得た。

得られたアジド体(1.5 g)をメタノール(30 ml)に溶かし、溶液の pH が 10 になるまで、28% MeONa 含有メタノール溶液を加え、1 時間攪拌した。反応液に Dowex

50WX8(H<sup>+</sup>)を溶液の液性が中性になるまで加え、樹脂を濾去し、溶媒を留去した。得られた残渣をメタノール(50 ml)と水(10 ml)の混合液に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(2.0 g)を加え、水素常圧下1晩攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を留去し、化合物2-2を1.2 g得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 4.20-4.30 (1H, br), 4.00-4.10 (1H, br), 3.80-3.85 (1H, br), 3.50-3.75 (14H, m), 2.75-2.90 (2H, m)

(B)ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールの合成



デキストラン 4(フナコシ社製、平均分子量 4000-6000)(20 g)の 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.5)(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光して 4℃で 10 日間攪拌後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えた。溶解後、室温で一晩攪拌し

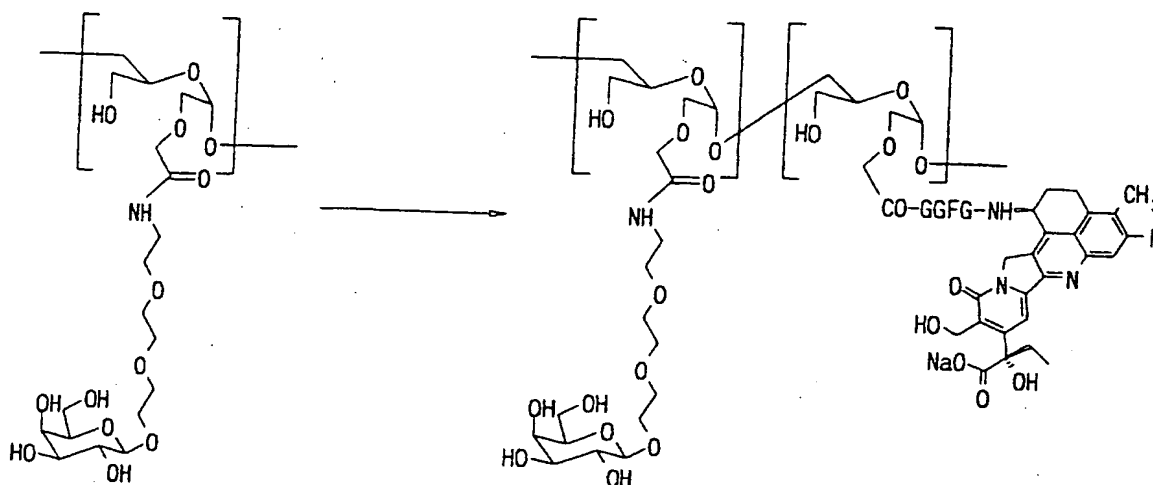
た。氷冷して、酢酸で pH5.5 に調整し、4 °C で 1 時間攪拌した。氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。以上の行程を 2 回行い、得られた 2 つの水溶液を 1 つにまとめ、バイオマックス-3 膜(ミリポア社製)を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液をバイオマックス-30 膜を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-3 膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール(12.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、9K であった。

水酸化ナトリウム(39.3 g)を水(282 ml)に溶かして得られる水溶液に上記の精製デキストランポリアルコール(9.4 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(56.4 g)を加えて溶解させた後室温で 20 時間反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-5 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチル(以下、CM と略す)デキストランポリアルコールのナトリウム塩(12 g)を得た。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を、水酸化ナトリウム(17 g)を水(120 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(24 g)を加えて溶解させた後室温で 20 時間反応させた。

この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-5 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、14K であり、糖残基あたりの CM 化度はアルカリ滴定から 0.7 であった。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(100 ml)に溶解し、実施例 1 の化合物 2-2 (800 mg)のメタノール(100 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(240 mg)を 2 時間おきに 3 回添加し、計 6 時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-3 を用いた限外濾過法により脱塩した。得られた水溶液を凍結乾燥し、標記化合物を 1.1 g 得た。本化合物中のガラクトース含有量をフ

エノール-硫酸法により定量した結果、糖 10 残基当たり、1.0 の割合であった。

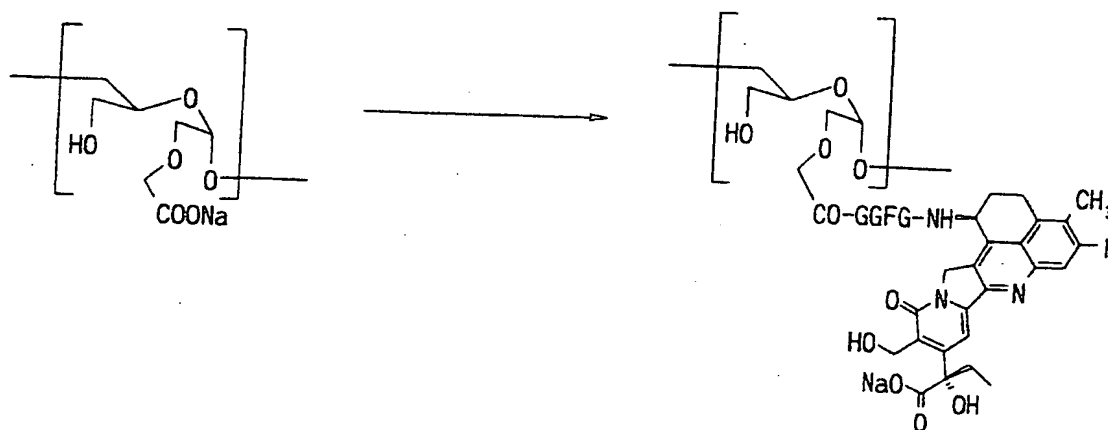
(C) ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



上記(B)で得られたガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(30 ml)に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩(150 mg)と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(35 mg)のメタノール溶液(40 ml)を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(35 mg)を 2 時間ごとに、3 回加えた後、1 晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm, 8 分)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 900mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl 水溶液、流速: 0.8 ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH 9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図 3 及び図 4 に示す。本化合物中の DX-8951 含有量を 30% アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて

定量したところ、4.9% (W/W)であった。

(D)CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



上記(B)で得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0g)を水に溶解し、Dowex-50WX8( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ )を通し、CM デキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を得た。得られた CM デキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を 50%N,N-ジメチルホルムアミドを含む水溶液に溶解し、この溶液に、トリエチルアミン(0.112 ml)と Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (350 mg) を含む N,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.9 g)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu\text{m}$ )で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 1.4g 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1M NaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図 6 及び図 9 に示す。本化合物中の DX-8951 含量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリ

ス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.2% (W/W)であった。

#### (E) D D S 化合物の測定

上記(C)で得られたガラクトース修飾 D D S 化合物および対照として上記(D)の D D S 化合物を注射用蒸留水にて溶解し、DX-8951 に換算した濃度が 0.5 mg/ml となるように調製した。これらの D D S 化合物水溶液を C57BL/6 マウスに一群 5 匹として尾静脈内に投与した。投与量は DX-8951 換算で 5 mg/kg とした。投与後、経時的 (0.5, 1, 2, 4 および 24 時間) に肝臓を採取し、これらの D D S 化合物量を求めた。得られた肝臓の重量に対し水を 5 倍量添加し、ホモジナイズした。その溶液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、さらに、上清を 15,000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた上清の 50  $\mu$ l に、pH6 の Britton-Robinson Buffer (B.R.B) により 2 mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液 450  $\mu$ l を添加し、40  $^{\circ}$ C で 2 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl 溶液を 500  $\mu$ l 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 20  $\mu$ l を HPLC 分析し、遊離した G-DX8951 を定量することで D D S 化合物量を求めた。この時、投与に用いた各 D D S 化合物水溶液を、蒸留水により 50、10、2  $\mu$ g/ml に調製し、それぞれ 50  $\mu$ l を上述の方法により酵素処理して G-DX8951 を定量したものを検量線とした。

#### HPLC 分析条件

カラム : Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100mm)

流速 : 1.0 ml/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出波長 (蛍光) : Ex. 375 nm、Em. 445 nm

溶出液 : メタノール : アセトニトリル = 1 : 2 (29%) 0.1% TFA (71%)

結果を図 5 に示す。上記のガラクトース修飾 D D S 化合物は、対象の D D S 化合物 (上記(D)) に比べて高い肝臓集積性を示した。

例7：ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成

デキストラン T500(ファルマシア社製、分子量 500K)(50 g)の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.5)(5000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g)の水溶液(5000 ml)を加えた。遮光して 4℃で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール(35.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 6.5 に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(70 g)を水(2000 ml)に懸濁させた液を加えた。溶解後、室温で一晩攪拌した。氷冷して、酢酸で pH5.5 に調整し、4℃で 1 時間攪拌した。氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液を限外濾過膜(1000K、フィルトロン社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥してデキストランポリアルコール(21.1 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、128K であった。

水酸化ナトリウム(13.84 g)を水(150 ml)に溶かして得られる水溶液に上記で得たデキストランポリアルコール(5 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸のナトリウム塩(61.6 g)を加えて溶解させた後室温で一晩反応させた。この反応液の pH を 8.5 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.2 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、428K であり、糖残基あたりの CM 化度はアルカリ滴定から 0.9 であった。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(500 mg)を水(50 ml)に溶解し、実施例 1 の化合物 2-2(400 mg)のメタノール(20 ml)溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(160 mg)のメタノール(20 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(120 mg)を 2 時間おきに 3 回添加し、計 6 時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、

バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥し、目的物を 600 mg 得た。本化合物中のガラクトース含量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖 10 残基当たり、1.7 の割合であった。

得られたガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩 (200 mg) を水 (3 ml) に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (27 mg) のメタノール溶液 (3 ml) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (7 mg) のメタノール溶液 (3 ml) を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (7 mg) を 2 時間ごとに、3 回加えた後、1 晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液 (10 ml) に溶かし、エタノール (100 ml) に滴下し、析出した沈殿を遠心分離 (3500 rpm) により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 180 mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl 水溶液、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (pH 9.0、0.1M トリス緩衝液中) をそれぞれ図 7 及び図 10 に示す。本化合物中の DX-8951 含量を 30% アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、3.7% (W/W) であった。

例 8 : 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル- $\beta$ -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトースの合成

特開平 5-202085 号公報に記載の方法により合成した 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル- $\beta$ -D-2-アセチルアミノ-2-デオキシ-3,4,6-トリアセチルガラクトース (2.64 g) をメタノール (10 ml) に溶解した溶液を氷冷した。この溶液にナトリウムメトキシドの 28% メタノール溶液 (0.64 ml) を加え、そのまま氷冷下で 5 時間攪拌した。反応液に酢酸 (0.186 ml) を加えた後、減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール = 9:1 溶



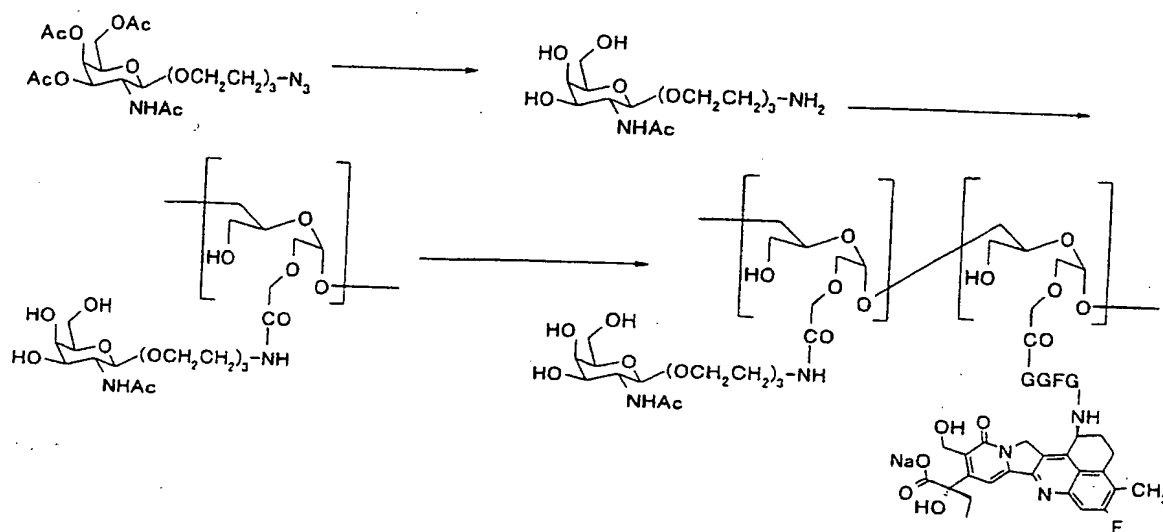
液)で精製して 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (1.98 g)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 4.44 (d, 1H, J=8.8Hz), 3.94-3.98 (m, 1H), 3.92 (dd, 1H, J=8.8, 10.7Hz), 3.83 (d, 1H, J=2.9Hz), 3.62-3.79 (m, 11H), 3.58 (dd, 1H, J=3.4, 10.7Hz), 3.49 (dd, 1H, J=5.9, 6.3Hz), 3.39 (t, 2H, J=4.9Hz), 1.99 (s, 3H).

上記の 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (640 mg)をエタノール(10 ml)に溶解した溶液にリンドラー触媒 (430 mg)を加え、常圧水素下 1.5 時間接触還元した。さらに、リンドラー触媒(215 mg)を加え、常圧水素下 3.5 時間接触還元した。触媒を濾去した後、濾液を減圧乾固して 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (601 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 4.32 (d, 1H, J=7.5Hz), 3.80-3.91 (m, 2H), 3.30-3.75 (m, 14H), 2.73 (t, 2H, J=6.5Hz), 1.98 (s, 3H).

例 9 : N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



例7で得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(375 mg)を水(10ml)に溶解し、例8で得られた 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル- $\beta$ -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (300 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(120 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(90 mg)を2時間おきに3回添加した。一晩攪拌した後、反応液からバイオマックス-50膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥し、N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール(443 mg)を得た。本化合物の N-アセチルガラクトサミン含量をエルソン-モルガン法で定量した結果、糖 10 残基あたり 1.6 の割合であった。

得られた N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール (200 mg) を水 (10 ml) に溶解し、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフロオロ酢酸塩 (30 mg) をメタノール(10 ml) に溶解した溶液、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(30 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(10 mg)を2時間おきに3回添加した。2時間攪拌した後、pH を 8.5 にした。反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥し、標記化合物(203 mg)を得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソー TSK Gel PW-6000XL、溶媒：20%アセトニトリル含有 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液(pH 10.0)：アセトニトリル=7:3 中、0.16 mg/ml)をそれぞれ図8および図11に示す。本化合物の医薬化合物の残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0)：アセトニトリル=7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 4.6% (W/W)であった。

例 10: CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX-8951 (Y' は p-フェニレン基を示す) の溶液 5  $\mu$ l に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製したババイン溶液を 95  $\mu$ l 添加した。この反応液を 40°C で 4 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100  $\mu$ l 加え、遊離した加水分解物 [DX-8951] を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6  $\times$  100 mm; 3.5  $\mu$ m, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) が 12 分間に 20% から 70% となる 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375nm および Em. 445nm) により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.7 分に溶出された。DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、4.0% と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.3% と算出された。

例 11: CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX-8951 の溶液 5  $\mu$ l に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液を 95  $\mu$ l 添加した。この反応液を 40°C で 4 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100  $\mu$ l 加え、遊離した加水分解物 [DX-8951] を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6  $\times$  100 mm; 3.5  $\mu$ m, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) が 12 分間に 20% から 70% となる 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375nm および Em. 445nm) により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.7 分に溶出された。DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、2.5% と算出された。

一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 1.7% と算出された。

例 12 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 100 μg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 の溶液 5 μl に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 95 μl 添加した。この反応液を 40°C で 4 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100 μl 加え、遊離した加水分解物 [NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951] を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6x100 mm; 3.5 μm, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) を 32% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375nm および Em. 445nm) により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.3 分に溶出された。NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、3.0% と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.1% と算出された。

例 13 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR (DXR: ドキソルビシン) 中の DXR 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した DDS 化合物の溶液 10 μl に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 190 μl 添加した。この反応液を 40°C で 2 時間インキュベートした後、アセトニトリルを 200 μl 加え、遊離した加水分解物 [DXR] を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry RP18 (4.6x100 mm; 3.5 μm, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) を 34% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 480nm および Em. 590nm) により加水分解物を検出した。この結果、DXR は約 3.8 分に溶出された。DXR を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DXR 含

有量を算出したところ、5.3%と算出された。一方、DXR を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DXR 含有量を算出した場合には 4.3%と算出された。

例 14 : CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の合成

W097/46260 の実施例 24 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 274K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4 のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(30 mg)を 50%メタノールを含有する 0.05 M コリジン-HCl 緩衝液(2 ml)に溶解させた。この溶液に W097/46260 の実施例 43 に記載の方法に準じて合成した Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の塩酸塩(4 mg)を含むメタノール溶液(400  $\mu$ l)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(2.4 mg)を含むメタノール溶液(240  $\mu$ l)を加え、2 時間攪拌した。これに 3 M 食塩水 30 ml を加え、バイオマックス-50K 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して表記化合物(25 mg)を得た。本化合物の医薬化合物の残基の含量は、PBS(pH7.4)中での 480 nm における吸光度に基づいて定量したところ、4.3%(W/W)であった。

例 15 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 の合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH(575mg)、HOSu (182mg)と DCC (326mg)を DMF (20ml)に溶解し、30 分間攪拌した。ここに、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩(500 mg)とトリエチルアミン(0.184 ml)を DMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で 3 日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィ(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOBzl を 560 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOBzl (560 mg)を 50%含水メタノール(60 ml)に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(1.5 g)を加え、水素常圧下、1 晩攪拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH を 300 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH (300 mg)とDCC (138 mg)とHOSu (77 mg)をDMFに溶かし、30分攪拌した。ここに、DX-8951(317mg)とトリエチルアミン(0.078ml)をDMFに溶かした溶液を加え、室温で1晩攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=10:1)で精製して、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951を400 mg得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951(300mg)をTFA(2ml)に溶かし、1時間反応させた後、反応液を濃縮した。得られた残査にエーテルを加え固化させ、上澄みを除去し、固体を乾燥してH-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩を250mg得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.45-8.55 (m, 2H), 8.28-8.35(m, 2H), 7.95-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.70-7.75 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 5H), 7.15-7.25 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.50-4.60 (m, 1H), 3.55-3.95 (m, 7H), 3.00-3.25 (m, 5H), 2.75-2.85 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.15-2.25 (m, 4H), 1.86-2.00 (m, 2H), 1.55-1.65(m, 2H), 1.45-1.55(m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.35Hz)

W097/46260の実施例24に記載の方法に準じて製造した平均分子量337K、カルボキシメチル化度(構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度)0.4のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)をDMF(10 ml)に溶かした。ここに、H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩(30 mg)、トリエチルアミン(10 μl)を含むメタノール(4ml)溶液を加え、さらに、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(200 mg)を含むメタノール(3 ml)溶液を加え、遮光下、室温で1晩攪拌した。反応液を3M食塩水で希釈し、限外濾過膜(50K)で低分子を除去し、0.22 μmのフィルターを通し、凍結乾燥して目的物を178 mg得た。

### 産業上の利用可能性

糖化合物で修飾したカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアとして用いた本発明のDDS化合物は、極めて臓器指向性が高く、優れた治療効果を発揮できる医薬として有用である。また、本発明のDDS化合物の測定方法は、DDS化合物の血中濃度やDDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確かつ簡便に定量することができるので、DDS化合物の臨床への適用に際して極めて有用な方法として利用できる。

## 請求の範囲

1. 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むDDS化合物。
2. 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した請求の範囲第1項に記載のDDS化合物。
3. スペーサーが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸である請求の範囲第2項に記載のDDS化合物。
4. 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のDDS化合物。
5. 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである請求の範囲第4項に記載のDDS化合物。
6. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるDDS化合物。
7. 該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第6項に記載のDDS化合物。
8. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができ



る請求の範囲第 6 項又は第 7 項に記載の D D S 化合物。

9. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスパーサーを介して結合したカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる D D S 化合物。

10. 該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第 9 項に記載の D D S 化合物。

11. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル部分の一部のカルボキシル基に 1 個のアミノ酸からなるスパーサー又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるスパーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる請求の範囲第 9 項又は第 10 項に記載の D D S 化合物。

12. 糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である請求の範囲第 1 項ないし第 11 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

13. 糖化合物が N-アセチルガラクトサミンである請求の範囲第 1 項ないし第 12 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

14. ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01 ~ 1.0 である請求の範囲第 12 項に記載の D D S 化合物。

15. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである請求の範囲第 1 項ないし第 14 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

16. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第 1 項ないし第 15 項のいずれか

- 1 項に記載の D D S 化合物。
- 1 7 . 医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第 1 項ないし第 16 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。
- 1 8 . 医薬化合物が抗腫瘍剤である請求の範囲第 17 項に記載の D D S 化合物。
- 1 9 . 医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第 1 項ないし第 18 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。
- 2 0 . 肝臓癌治療剤である請求の範囲第 19 項に記載の D D S 化合物。
- 2 1 . 請求の範囲第 1 項ないし第 20 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物の製造に使用するための糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール。
- 2 2 . 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコール。
- 2 3 . 糖化合物で修飾されたカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー。
- 2 4 . ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した D D S 化合物の測定方法であって、該 D D S 化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。
- 2 5 . 生体試料中に含まれる該 D D S 化合物の濃度測定に用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。
- 2 6 . 該 D D S 化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。
- 2 7 . 該加水分解物が医薬化合物である請求の範囲第 24 項ないし第 26 項のいずれか 1 項に記載の方法。
- 2 8 . 該加水分解物が医薬化合物の残基にスペーサーの一部が結合した化合物で

ある請求の範囲第 24 項ないし第 26 項のいずれか 1 項に記載の方法。

29. スペーサーの一部がスペーサー由来の 1 個のアミノ酸である請求の範囲第 28 項に記載の方法。

30. 該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する多糖誘導体である請求の範囲第 24 項ないし第 29 項のいずれか 1 項に記載の方法。

31. 該高分子キャリアーがカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールである請求の範囲第 30 項に記載の方法。

32. 該 DDS 化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第 24 項ないし第 31 項のいずれか 1 項に記載の方法。

33. スペーサーが N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly- で表されるテトラペプチド又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe- で表されるテトラペプチドである請求の範囲第 24 項ないし第 32 項のいずれか 1 項に記載の方法。

34. スペーサーが N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO- で表される基又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH<sub>2</sub>-O-CO- で表される基 (式中、Y' は p-フェニレン基を示す) である請求の範囲第 24 項ないし第 32 項のいずれか 1 項に記載の方法。

35. ペプチダーゼが  $\alpha$ -キモトリプシン又はパパインである請求の範囲第 24 項ないし第 34 項のいずれか 1 項に記載の方法。

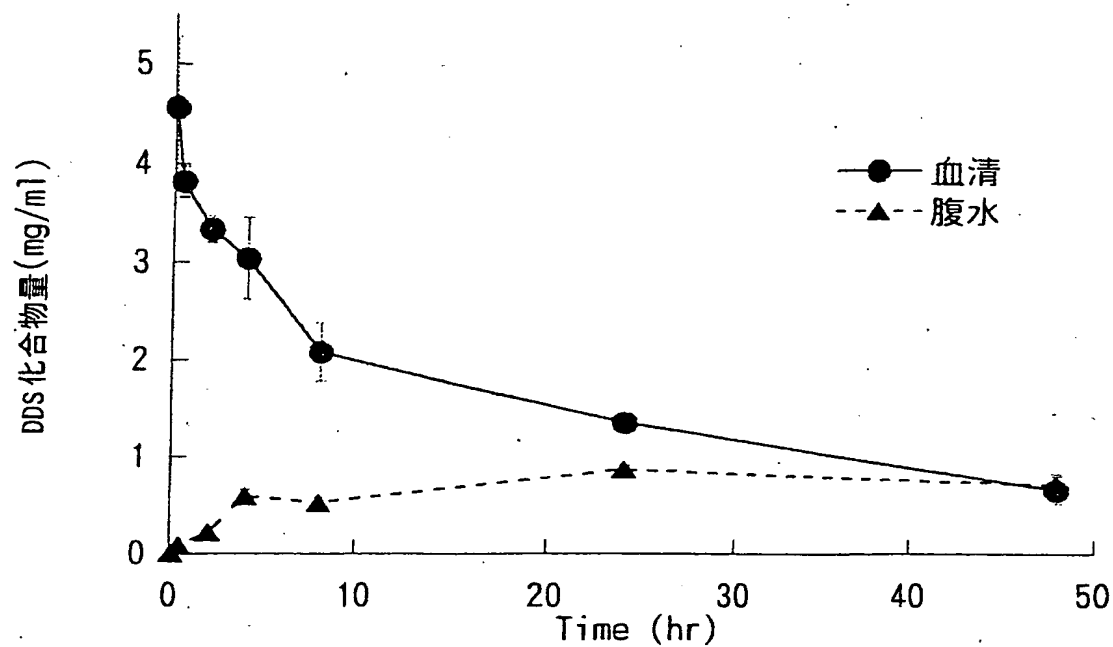
36. 医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第 24 項ないし第 35 項のいずれか 1 項に記載の方法。

37. N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly- で表されるテトラペプチド又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe- で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールと (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合した

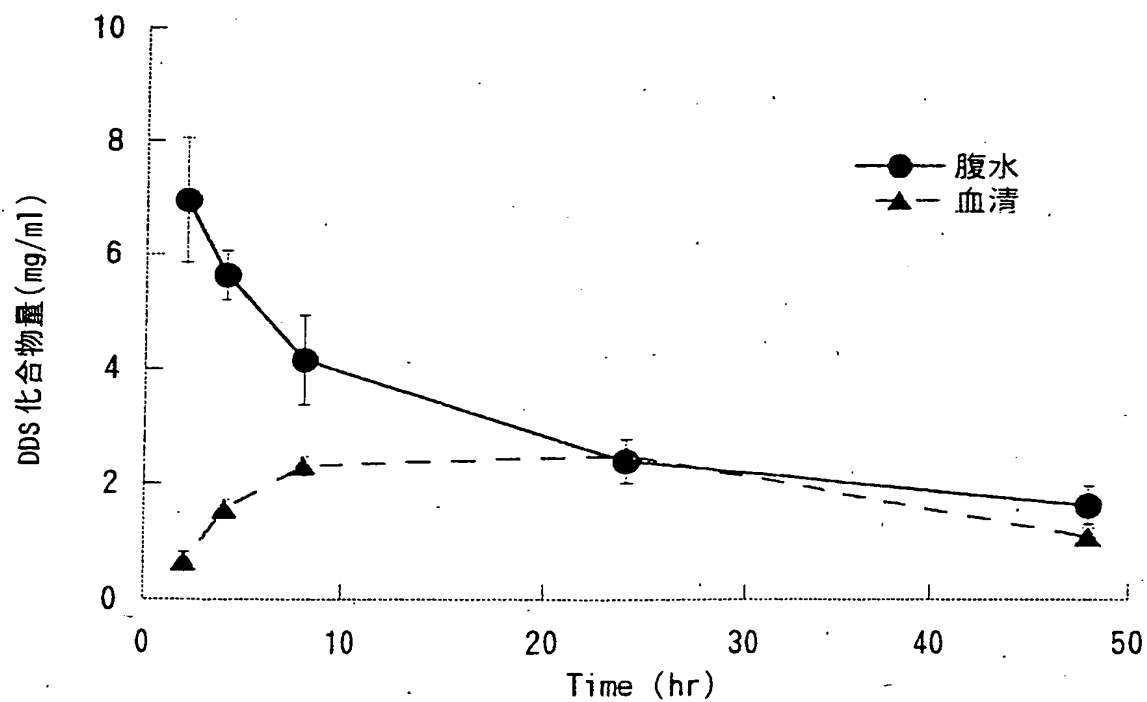
DDS化合物の測定に用いる請求の範囲第24項ないし第29項のいずれか1項に記載の方法。

38. ペプチダーゼとして $\alpha$ -キモトリプシン又はパパインを用い、加水分解物として (1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定する請求の範囲第37項に記載の方法。

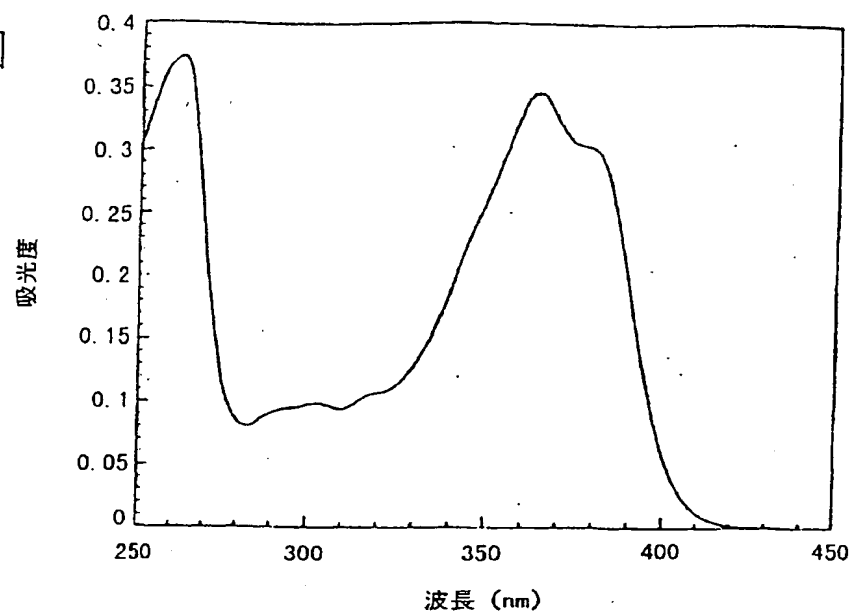
第1図



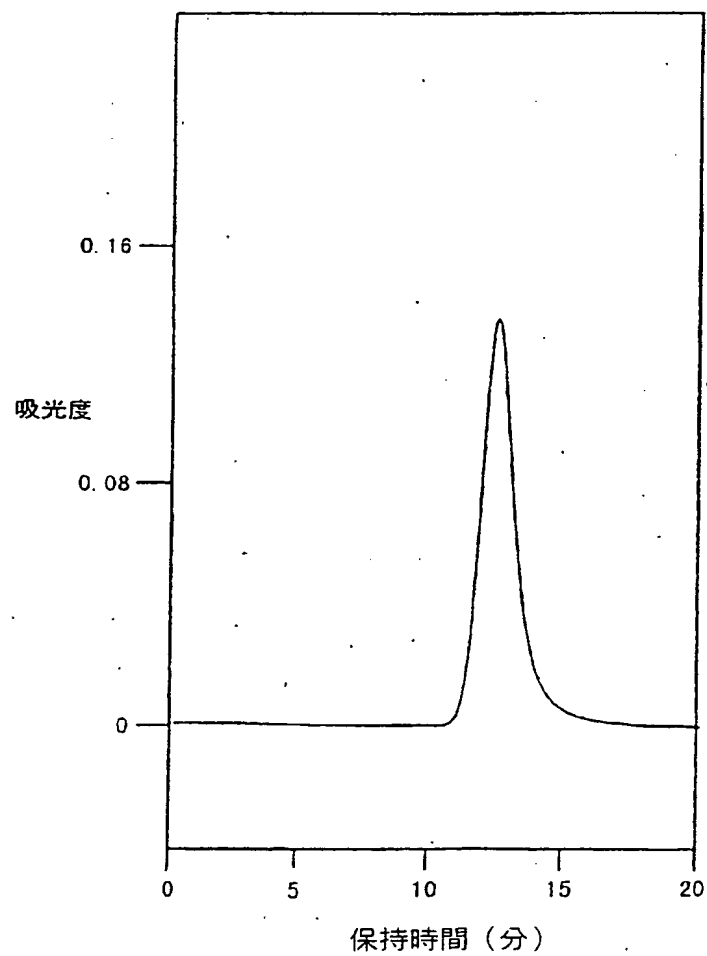
第2図



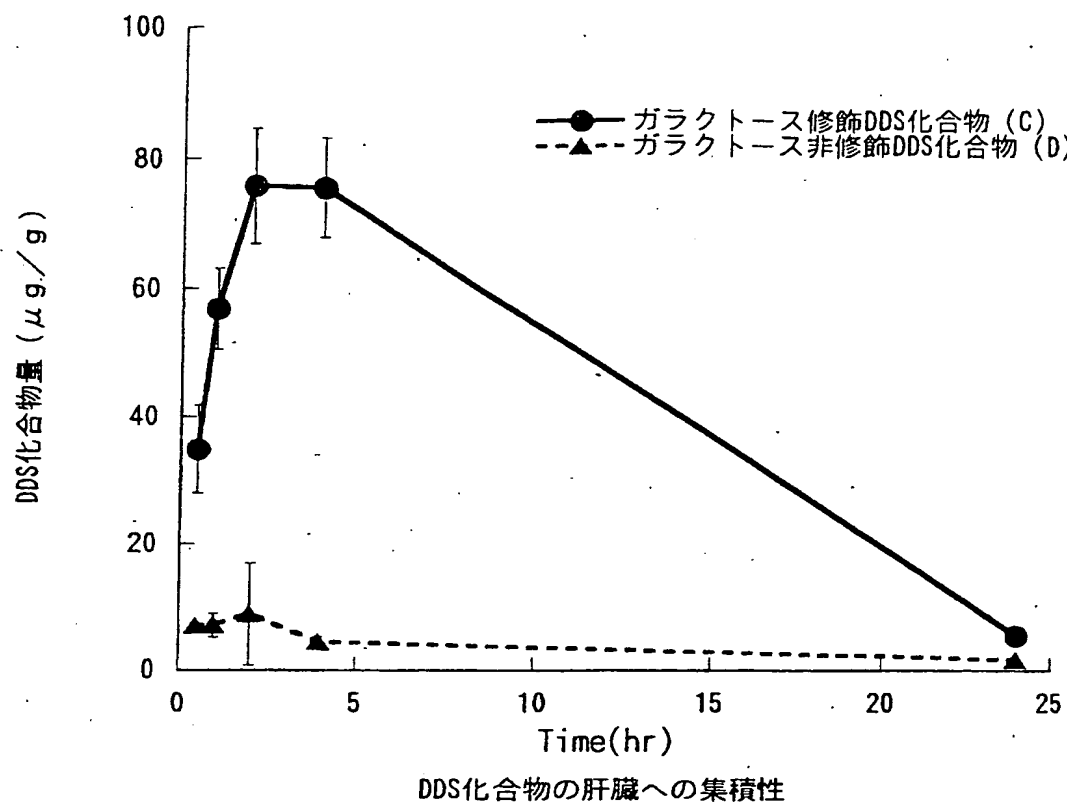
第3図



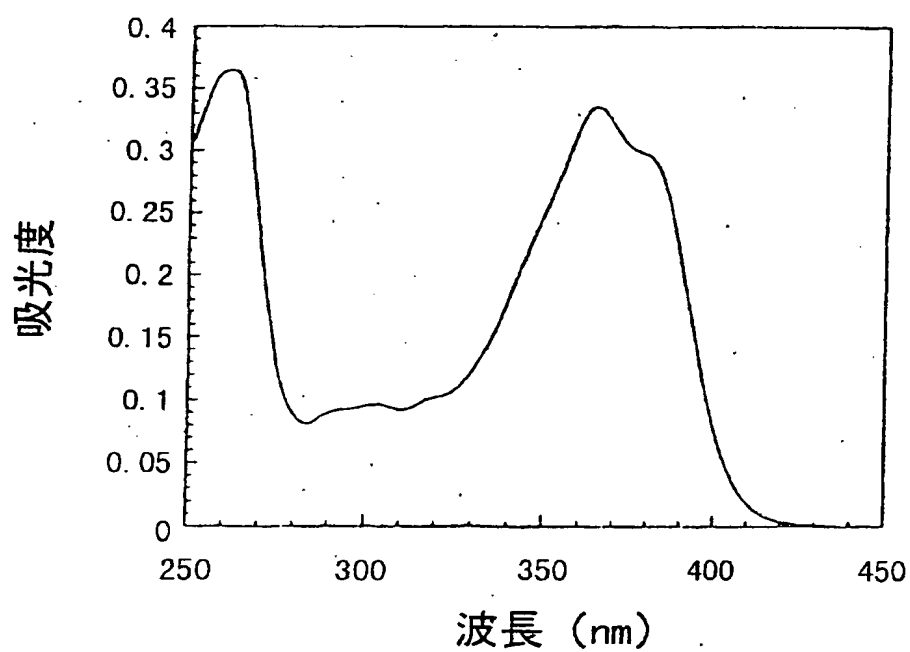
第4図



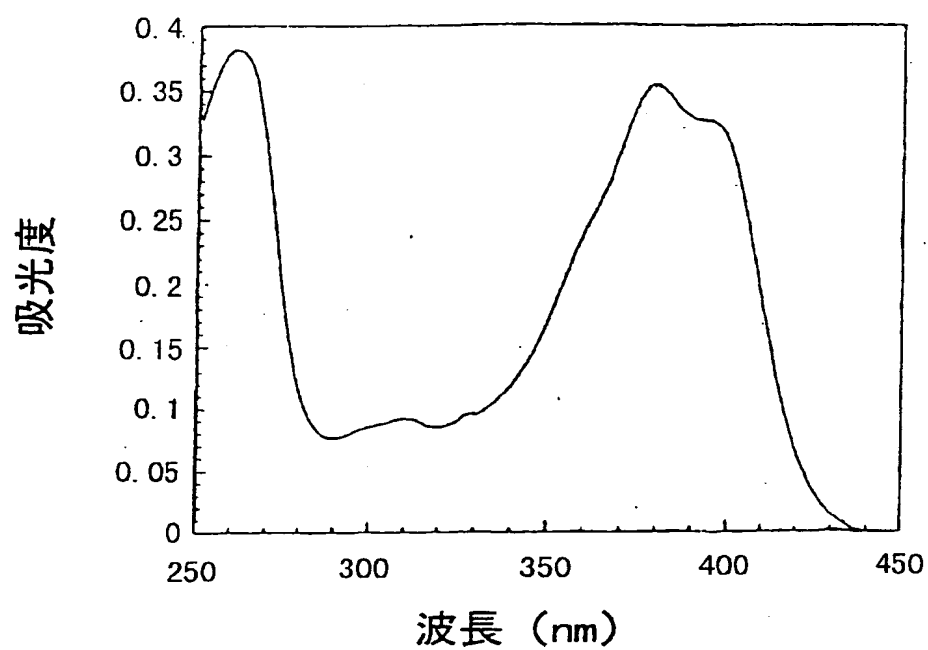
第5図



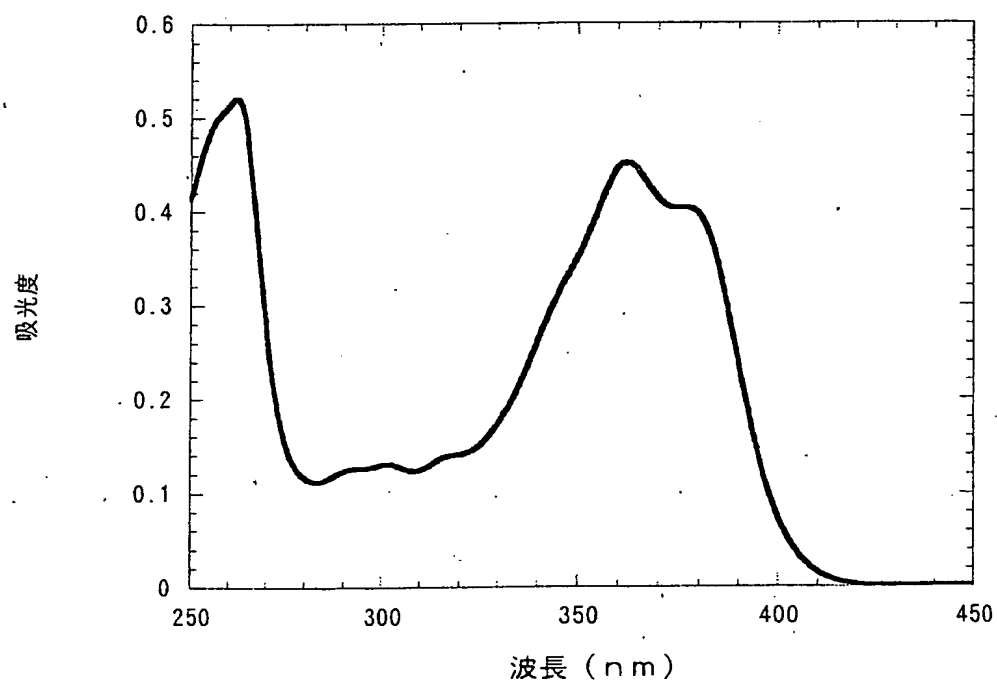
第6図



第 7 図

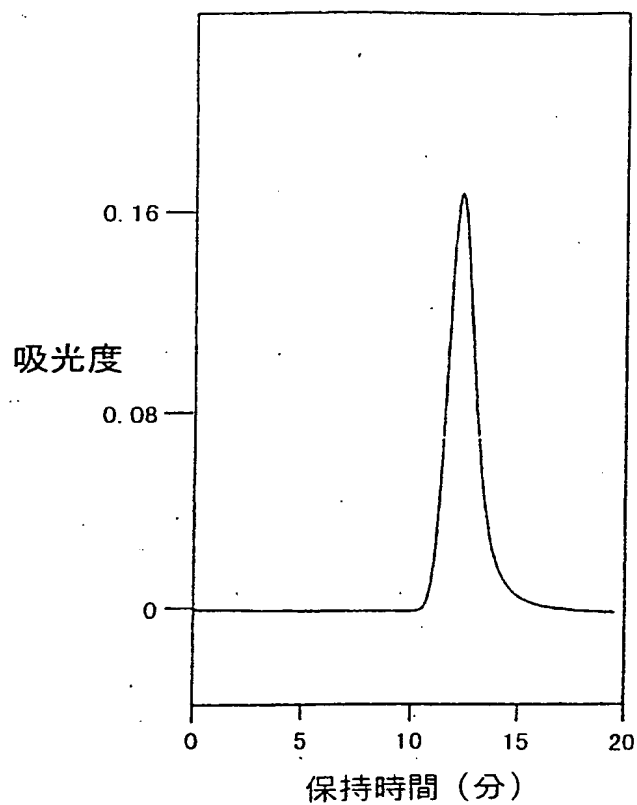


第 8 図

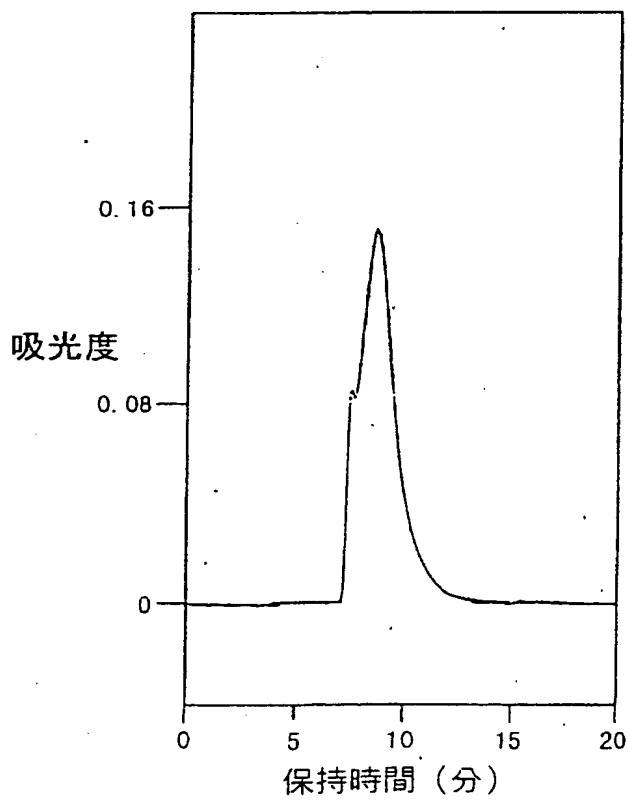




第 9 図



第 10 図



## 第 1 1 図

